N° d'ordre : 330

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Michel MARCHAND

L'épuration biologique des eaux résiduaires de papeterie par infiltration dans le sol : modalités, biodégradation des alcali-lignines.

Soutenue le 16 juin 1971, devant la Commission d'Examen :

MM. J. SÉCHET, *Professeur* ..... *Président.*

J. POCHON, *Chef du Service de Microbiologie du sol à l'Institut Pasteur, Membre correspondant de l'Institut* .....

H. SCHOELLER, *Professeur honoraire* ..... } *Examinateurs.*

J. EYMÉ, *Professeur* .....

J. VINDT, *Professeur, Directeur de l'Unité de Biologie* .....

TEXTE

— 1971 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543509_0010

N° d'ordre : 330

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Michel MARCHAND

L'épuration biologique des eaux résiduaires de papeterie par infiltration dans le sol : modalités, biodégradation des alcali-lignines.

Soutenue le 16 juin 1971, devant la Commission d'Examen :

MM. J. SÉCHET, *Professeur* ..... *Président.*

J. POCHON, *Chef du Service de Microbiologie du sol à l'Institut Pasteur, Membre correspondant de l'Institut* .....

H. SCHOELLER, *Professeur honoraire* ..... } *Examinateurs.*

J. EYMÉ, *Professeur* .....

J. VINDT, *Professeur, Directeur de l'Unité de Biologie* .....

TEXTE

— 1971 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INTRODUCTION

L'obtention d'eau pure, en quantité et en qualité, et l'évacuation des eaux usées constituent les deux grands problèmes posés actuellement aux hygiénistes et aux industriels. L'eau est indispensable à la vie.Ce n'est pas seulement un liquide servant de support et de véhicule aux diverses opérations industrielles, mais c'est, avant tout, un milieu biologique. Par l'oxygène, le gaz carbonique, les matières organiques et les sels minéraux qu'elle contient en solution, l'eau permet la vie animale et végétale.D'elle dépend l'équilibre naturel des rivières et des lacs. La modification permanente de sa composition, par l'élimination abusive de déchets domestiques et industriels, provoque une pollution généralisée et peut aller jusqu'à compromettre la santé des individus, réduire l'activité industrielle, déséquilibrer les cycles biologiques et détruire les sites naturels. Depuis quelques années de nombreux cris d'alarme, en provenance de personnalités éminentes, se sont élevés, sensibilisant l'opinion publique. Les parcs de protection de la nature se créent actuellement en France et montrent bien la prise de conscience de ce problème. "Mieux vaut prévenir que guérir" : dans ce but, les efforts techniques et financiers doivent porter sur l'épuration des eaux usées avant leur rejet dans le milieu naturel.

L'implantation de forêts de Pin, sur le sable des Landes de Gascogne, a entraîné la création d'industries locales utilisant le bois comme matière première. Le Pin maritime, trop chargé en résine, ne pouvait convenir à la fabrication du papier par le procédé classique au bisulfite.Le traitement artisanal de la résine et de ses dérivés constitua, alors, avec les exploitations traditionnelles du bois, la seule source de revenus. En 1883, la fabrication du papier par le procédé au sulfate fut applicable aux résineux. Néanmoins, il fallut attendre l'année 1928 pour que les premières papeteries s'installent dans le Sud-Ouest. Elles prirent rapidement un grand essor et se placent actuellement au premier rang dans l'économie régionale. L'industrialisation de plus en plus poussée et l'augmentation de la production - on estime,généralement, que celle-ci doublera d'ici la fin du siècle- se traduisent par la consommation d'un volume de plus en plus élevé d'eau et par le rejet inévitable d'une partie de ces eaux, alcalines, chargées de lignines solubilisées et de produits soufrés, non exploitables parce que trop dilués.

Les eaux résiduaires de la Papeterie de la Cellulose du Pin, située près de Facture (Gironde), étaient, initialement, déversées dans un

cours d'eau avoisinant se jetant dans le Bassin d'Arcachon. De profondes perturbations biologiques prirent naissance dans cette rivière, nuisant à son esthétique. Afin de résoudre certains problèmes d'ordre microbiologique, les ingénieurs de l'Usine firent appel au Laboratoire de Botanique appliquée et de Microbiologie, de la Faculté des Sciences de Bordeaux. Dans le but de préserver cette région à vocation touristique et de ne pas risquer de porter préjudice à l'ostréiculture, source importante de revenus, il fut décidé d'un commun accord, en 1959, d'éliminer les eaux résiduaires par épandage et infiltration dans le sol en utilisant des terrains perméables, de vastes superficies, à la fois proches de l'usine et à l'écart de tout groupement d'habitations. Cette pratique de rejet est fort peu employée. Par conséquent, les données techniques pouvant servir de références n'existent pour ainsi dire pas ; même si cela était, la transposition à des sites et à des sols différents resterait délicate. Il fallut donc innover en réduisant au maximum les risques que comporte toute innovation. Il importait de déterminer la direction du mouvement de la nappe souterraine, de suivre son cheminement et d'analyser les modifications des liquides au sein du sol. En d'autres termes, il convenait de savoir si une épuration biologique pouvait s'effectuer et d'en apprécier l'efficacité tout en demeurant vigilant vis-à-vis des risques encourus.

A notre entrée au laboratoire dans les fonctions d'Assistant, en 1959, Monsieur le Professeur SÉCHET nous proposa de participer à ses recherches entièrement originales et nous suggéra l'étude de l'épuration biologique des eaux résiduaires de papeterie. Il ne nous cacha pas que, dans ce domaine pratiquement inconnu, patience et prudence seraient indispensables. Commencés à la fin de l'année 1959, nos travaux se sont poursuivis pendant onze ans, nécessitant l'analyse de plus de deux mille échantillons d'eau. Nous nous sommes attaché à suivre parallèlement les variations physico-chimiques et l'évolution microbiologique des eaux infiltrées en nous consacrant plus particulièrement au problème de la biodégradation des alcali-lignines.

Après avoir relaté l'historique en insistant sur les solutions actuellement appliquées à la pollution par les eaux résiduaires de papeterie, nous décrirons les techniques d'épandage et les méthodes d'études employées. Le premier chapitre traitera des caractéristiques physico-chimiques des eaux prélevées susceptibles d'influer sur les processus d'épuration. Le chapitre II mettra en évidence les relations existant entre le sol et l'effluent. Le troisième chapitre sera consacré à la Microbiologie des eaux. Grâce aux numérations, aux isolements et à l'identification des souches, il renseignera sur l'importance de l'activité microbienne et sur sa nature. Quant au dernier chapitre, il relatera les résultats des essais poursuivis dans l'étude de la biodégradation des alcali-lignines sous l'influence des diverses souches isolées et en présence de différents milieux nutritifs. Nous n'envisagerons pas l'étude biochimique des produits de dégradation des lignines. Ce domaine, très vaste et fort complexe, dépasse le cadre de nos investigations et ne saurait être abordé par des recherches isolées. Notre but sera de mettre en évidence la ligninolyse en adoptant les techniques déjà utilisées pour l'examen des variations physico-chimiques des eaux dans le sol.

Avant d'exposer ces recherches, nous avons l'agréable devoir de remercier tous ceux qui ont permis le développement et la conclusion de nos travaux.

Monsieur le Professeur SÉCHET a bien voulu nous inclure au sein de son laboratoire et nous faire prendre une part active à ses recherches personnelles. Nous le remercions de la bienveillante attention avec laquelle il a guidé notre travail, de la sympathie qu'il a toujours manifesté à notre égard et de l'aide tant scientifique que matérielle qu'il nous a apportée. Nous le prions de trouver ici l'expression de notre respectueux attachement et l'assurance de notre profonde gratitude.

Monsieur le Docteur POCHON, Membre correspondant de l'Institut, Chef du Service de Microbiologie du sol à l'Institut Pasteur, nous honore en acceptant de siéger dans le Jury appelé à juger notre thèse. Nous le remercions pour les précieux conseils qu'il nous a si aimablement prodigués ; nous tenons à lui témoigner notre très grande reconnaissance pour la sollicitude avec laquelle il nous a conseillé, nous faisant bénéficier de sa grande autorité.

L'épuration des eaux résiduaires constitue un problème que Monsieur le Professeur SCHOELLER, Professeur Honoraire d'Hydrogéologie, connait parfaitement puisqu'il en a étudié les phénomènes physiques d'infiltration. Nous lui sommes redevable du temps qu'il nous a consacré et des fructueuses remarques concernant la partie hydrogéologique de notre thèse ; qu'il en soit très sincèrement remercié.

C'est avec intérêt que Monsieur le Professeur EYMÉ et Monsieur le Professeur VINDT, Directeur de l'Unité de Biologie, ont suivi le déroulement de nos recherches et nous ont donné toute facilité pour mener à bien notre travail en ne ménageant pas leurs encouragements. Nous leur adressons nos plus vifs remerciements et sommes sensible à l'honneur qu'ils nous font en acceptant de faire partie de notre Jury.

Nous sommes très reconnaissant à nos Collègues du laboratoire, Mademoiselle GASSIAN et Monsieur BAROUX, Maîtres-Assistants, de l'atmosphère amicale qu'ils ont su faire régner tout au long de nos recherches. Auprès d'eux, nous étions toujours assuré de rencontrer l'aide et la compréhension que nous pouvions souhaiter.

Nous n'aurions garde d'oublier le personnel technique et administratif du laboratoire et des laboratoires amis dont la compétence et le dévouement ont rendu possible la réalisation matérielle de ce travail ; nous sommes heureux de leur témoigner ici toute notre sympathie

Notre dette de reconnaissance s'étend également à l'Usine de la Cellulose du Pin. Nous remercions Monsieur le Directeur de nous avoir donné libre accès à ses installations, Monsieur CHADEYRON, Directeur technique,

Monsieur LEGRAND, Ingénieur principal et Monsieur FOURNIER, Chef du Service "Laboratoire Contrôle" auprès desquels nous avons trouvé constamment l'accueil le plus amical et un concours de tous les instants. Nos remerciements s'adressent également aux Cadres et Techniciens de l'Usine dont nous avons pu apprécier toute la conscience professionnelle lors de l'expérimentation et au cours des prélèvements.

Enfin, je tiens à exprimer mon affectueuse reconnaissance à mon épouse, à mes parents et à mes amis qui, de près ou de loin, m'ont apporté, avec une patience inlassable, soutien et réconfort.

HISTORIQUE

La pollution des eaux, problème international, est liée à l'expansion industrielle, à l'accroissement démographique qui s'accompagne d'une concentration de la population dans les villes, et également à l'élévation du niveau de vie entraînant une pollution de type collectif (hydro-carbures, détergents synthétiques, engrais agricoles, éléments radioactifs).Les efforts de décentralisation de l'industrie aggravent encore la pollution en la généralisant. En France, le retard pris en matière de traitement est immense.Les résultats d'une politique de laisser-aller se font lourdement sentir à notre époque où les ressources en eau s'amenuisent et deviennent un facteur limitatif de développement. Avec R. COLAS (61), on peut citer l'exemple suivant. Aux Etats-Unis, la consommation moyenne d'eau par habitant et par an est de 1 200 m3. Sur le même niveau, la France employerait par année 60 milliards de m3, soit environ le tiers du volume écoulé par nos rivières, et la terre entière, le 1/8ème du débit des fleuves. Cela ne permet pas d'envisager une population mondiale supérieure à 20 milliards d'habitants, chiffre atteint dans 100 ans si l'on en croit les démographes. Il convient donc de lutter activement contre les pollutions et d'en rechercher les causes.

A - LES CAUSES DE LA POLLUTION DES EAUX

Elles sont principalement au nombre de deux, si l'on admet la distinction classique entre pollution domestique et pollution industrielle :

La pollution domestique comprend les eaux pluviales, les eaux d'arrosage et de lavage publics, les eaux ménagères et les eaux vannes (humaines et animales). L'ensemble constitue les eaux usées domestiques encore appelées eaux d'égout. De composition relativement constante, elles renferment des matières en suspension (terre, sable, déchets animaux et végétaux), des matières en solution, minérales et surtout organiques (substances azotées et carbonées).

La pollution industrielle groupe les eaux utilisées par les différentes industries (eaux résiduaires industrielles). Le produit à fabriquer conditionne la nature tant physique que chimique de ces eaux. Les caractères de la pollution seront donc complexes. On peut cependant classer les eaux résiduaires en trois grandes catégories :

- les eaux résiduaires à caractère minéral dominant. Exemples : exploitations des mines, traitements des minerais et des terres, industries métallurgiques, industries chimiques minérales. Les eaux sont plus ou moins chaudes avec des matières en suspension grossière ou colloïdale, des matières en solution, acides ou basiques, oxydantes ou réductrices (chromates, sulfates), toxiques ou antiseptiques (sels de plomb, arsenic, dérivés du soufre, cyanure).

- Les eaux résiduaires à caractère organique dominant. Exemples : abattoirs et ateliers de traitement des déchets animaux, industries alimentaires en général (laiteries, sucreries, brasseries, distilleries, fabriques de conserves ...). Les eaux riches en matières solides (terre, sable ....) dues au lavage, en débris végétaux et animaux (fibres animales et végétales) renferment de nombreux produits fermentiscibles (graisse, matières carbonées et protéiques, sels).

- Les eaux résiduaires à caractère mixte (composées de matières minérales et de produits organiques plus ou moins fermentiscibles).Exemples : industries textiles, industries de la cellulose (papeterie et cartonnerie), industries du caoutchouc, du cuir, distilleries de bois et charbon.Les caractères de la pollution se rapprochent de ceux des eaux résiduaires à caractère minéral. En plus des précédents, on distingue des produits savonneux,des sels de dégraissage, des graisses diverses, des matières carbonées associées à des composés phénoliques.

A ces différentes causes s'ajoutent également les pollutions par déversement d'hydrocarbures et de déchets radioactifs, que nous citons pour mémoire ; leurs études dépassent le cadre de nos investigations.

De telles eaux usées, domestiques ou industrielles, rejetées dans les rivières entraînent de profondes perturbations.

B - LES CONSEQUENCES DE LA POLLUTION

Une commission d'experts européens de l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.), réunie à Genève en 1961, a donné de la pollution la définition suivante : "Un cours d'eau est considéré comme étant pollué lorsque la composition ou l'état de ses eaux sont, directement ou indirectement, modifiés du fait de l'activité de l'homme dans une mesure telle que celles-ci se prêtent moins facilement à toutes les utilisations auxquelles elles pourraient servir à leur état naturel ou à certaines d'entre elles".

La conséquence immédiate est l'aspect désagréable de la rivière et de ses rives. L'eau est colorée, trouble, avec écumes et boues flottantes. Avec l'augmentation de la température en été et un débit hydrique plus faible, les boues les plus profondes entrent en fermentation et se détachent. Des déchets divers sont visibles dans les endroits peu profonds. Les rives se recouvrent de dépôts suspects et malodorants.

Les facteurs physiques de l'effluent modifient profondément l'équilibre biologique des rivières : l'échauffement des eaux en diminue la qualité industrielle et abaisse la teneur en oxygène. La coloration et la turbidité constituent un obstacle à la pénétration des rayons solaires indispensables à la fonction chlorophyllienne.

Les facteurs chimiques provoquent de plus graves conséquences. Les matières en suspension, favorisant l'envasement, s'opposent au développement des organismes "de fond" (plantes chlorophylliennes utiles aux poissons) et peuvent causer l'inondation des régions riveraines. Certaines fibres (laine par exemple) se révèlent très dangereuses pour les poissons qu'elles asphyxient en se fixant sur leurs branchies. Les matières en solution peuvent faire varier le pH de la rivière ; une acidification accroît l'agressivité de l'eau à l'égard des substrats métalliques et pierreux et peut devenir toxique pour les poissons qui résistent très difficilement à un pH inférieur à 5,5. En revanche, l'alcalinisation modérée peut atténuer la toxicité de certaines substances. Les matières organiques servent surtout à enrichir la rivière en éléments nutritifs et de ce fait permettent le développement abondant de micro-organismes aérobies qui, pour minéraliser les matières en solution, empruntent l'oxygène dissous dans l'eau. La teneur en oxygène libre diminue et lorsqu'elle est inférieure à 5 mg/l (c'est-à-dire 50 % de la saturation à la température de 15°C), les espèces les plus sensibles, les salmonidés (truite, saumon ...), meurent. Les espèces les plus résistantes, cyprinidés (carpe, vairon, goujon ...), exigent une teneur minimum de 3 mg/l (soit 30 % de la saturation à la température de 15°C). A ceci, s'ajoutent les phénomènes de fermentation anaérobie entraînant le dégagement de gaz nauséabonds (hydrogène sulfuré, hydrogène phosphoré, mercaptans), la production de catabolites souvent toxiques pour la faune (amines de décarboxylation, crésols, phénols) et qui acidifient le milieu (acides organiques : par exemple : fermentation butyrique).

Le rejet de sels minéraux doit être limité si l'on désire utiliser l'eau pour l'alimentation ou pour des usages industriels (absence de sels de fer, de calcium et de magnésium). Une teneur élevée en sels minéraux entraîne un développement de micro-organismes chimio-autotrophes donnant naissance à une pollution dite secondaire.

Quant aux substances toxiques, leur rejet est formellement interdit.

En résumé, le déversement d'eaux usées dans une rivière se traduit par une augmentation des matières en suspension, par la présence de substances gênantes ou toxiques et enfin, conséquence la plus grave et la plus répandue, par une diminution de la teneur en oxygène dissous dans l'eau.Ce dernier aspect du problème de la pollution des eaux est à l'origine de notre travail et nous allons décrire les circonstances qui nous ont amené à entreprendre des recherches dans ce domaine.

L'usine de la Cellulose du Pin, située près de Facture, est spécialisée dans la fabrication de papier Kraft par le procédé "au sulfate", la

matière première étant fournie par le bois de Pin. Ce dernier, préalablement écorcé puis réduit en copeaux de 2 à 3 cm, est introduit dans un lessiveur en présence de lessive de soude et de sulfure de sodium. Le chauffage de l'ensemble, sous très forte pression, permet de solubiliser et d'extraire les composés ligneux du bois et de libérer les fibres de cellulose. Le mélange de fibres de cellulose en suspension dans un liquide chargé de matières organiques du bois autres que la cellulose (liqueur noire) est déversé dans un diffuseur. On procède par diffusion méthodique à la libération de la cellulose de sa liqueur noire en recueillant celle-ci sans la diluer. Les fibres de cellulose subissent de nombreux lavages. La pâte obtenue, raffinée à la papeterie,sera transformée en papier et la liqueur noire envoyée à l'atelier de régénération de la soude. Malgré l'économie de l'eau représentée par un recyclage de plus en plus perfectionné, un volume important d'eaux de lavage inutilisables,fortement alcalines et riches en matières organiques et minérales (eaux résiduaires),doit être éliminé. Ce problème de l'élimination des déchets est commun à toutes les industries. La solution couramment employée qui conditionne le site géographique de l'usine est leur rejet dans les cours d'eau avoisinants.

L'usine de la Cellulose du Pin évacuait ses eaux usées dans l'Eyre, rivière se jetant dans le Bassin d'Arcachon. Au bout de quelque temps,la présence inhabituelle de ces eaux entraîna un profond déséquilibre biologique de la rivière.Les propriétaires riverains du cours inférieur de l'Eyre et les pêcheurs du port d'Audenge se plaignirent de l'abondante prolifération de touffes glaireuses qu'ils dénommèrent "mucilages". Ils attribuèrent leur origine à l'agglomération de fibres cellulosiques rejetées dans les effluents de l'usine située en amont. Outre leur aspect désagréable, les "mucilages" obstruaient les mailles des filets de pêche. En 1952, SÉCHET (203) définit la nature exacte de ces touffes glaireuses : les mucilages étaient en réalité des colonies géantes de *Thiothrix*, bactérie appartenant à l'ordre des Thiobactériales (ou Sulfuraires) et à la famille des Beggiatoacées. Les produits soufrés (sulfates, sulfites, hyposulfites) des eaux résiduaires étaient réduits en hydrogène sulfuré notamment par *Desulfovibrio desulfuricans*. Cette bactérie anaérobie a été signalée comme spécifique de la microflore des rivières polluées par des effluents de papeterie, en 1964 par PALUCH (174) et en 1965 par TEZUKA (223), l'hydrogène sulfuré étant ensuite oxydé par *Thiothrix*,avec mise en réserve de soufre dans le corps bactérien. Le cycle du soufre était ainsi réalisé dans la rivière.

La présence de ces micro-organismes est un phénomène tout à fait normal : ils existent dans les eaux où s'effectue la décomposition des matières organiques. Une mise au point de HURIET en 1959 (118) résume les travaux américains du National Council for Stream Improvement (1957-58) et allemands de SCHEURING et HÖHNL (199). D'après ces auteurs, de nombreuses bactéries et champignons se développent dans les eaux polluées : *Sphaerotilus natans*,*Sphaerotilus dichotomus* (Algobactéries de l'ordre des Chlamydobactériales), *Beggiatoa alba*, *Thiothrix nivea* (Algobactéries, Thiobactériales), *Zooglea ramigera* (Pseudomonadacées), *Leptomitus lacteus* (champignon inférieur,Oomycètes) et *Fusarium aquaeductum* (Ascomycètes). L'élément dominant, *Sphaerotilus natans*, prolifère dans les eaux fraîches, de printemps et d'automne, à pH neutre ou légèrement alcalin,et dont la vitesse du courant varie entre 20 et 30cm/s.

L'assimilation des matières azotées a lieu uniquement sous forme organique, celle des glucides sous forme de pentoses, hexoses et acides organiques. Le rapport optimum C/N est de 20.

Dans l'Eyre, ce développement spectaculaire de *Thiothrix* s'observa pendant plusieurs années. Leur zone de croissance s'étendit peu à peu en aval, leur importance variant au cours des saisons. CAZAUX et SECHET (56) constatèrent en 1957 qu'ils disparaissaient parfois pendant la saison hivernale pour être remplacés par des amas macroscopiquement identiques de champignons filamenteux de l'espèce *Leptomitus lacteus*. Les changements de pH, liés à un débit plus important de la rivière, et de température, en étaient responsables. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de ZEHENDER et BÖCK en 1964 (246) : l'optimum de croissance a lieu à pH 6 et à la température de 8°C. CAZAUX et SECHET (56) remarquèrent également que les colonies de *Thiothrix* prolifèraient surtout en été, leur pH optimum de croissance se situant entre 7 et 8, cependant, elles résistent à un pH légèrement inférieur à 5. La même année, LUBET et SECHET (149) appliquèrent des méthodes d'étude et de contrôle biologiques des eaux résiduaires afin de rechercher un remède à cette infestation du cours d'eau.

L'appréciation de la pollution des rivières par les effluents de papeterie peut être effectuée suivant deux techniques : l'étude de l'action des effluents d'usine sur le développement des micro-organismes ou la détermination du seuil de toxicité des eaux résiduaires sur les poissons, selon le test du Paraclet décrit par BREBION (24). Ces auteurs en conclurent "que le test du développement des micro-organismes s'avère beaucoup plus fidèle pour représenter les phénomènes qui se déroulent en rivière. Il est utile de préciser aussi que les seuils de toxicité propres de l'eau sur le vairon sont nettement supérieurs aux concentrations en différents produits des eaux résiduaires ; celles-ci n'ont manifesté aucune toxicité à l'égard du poisson. On constate seulement la désertion du poisson, désertion influencée par le développement des micro-organismes".

En 1957, BERTHIER, FOURNIER et LEGRAND (16) signalèrent que 6 à 8 mg de matières organiques par litre suffisaient pour entraîner le développement de *Thiothrix* : une épuration dût être envisagée.

Avec une industrialisation accrue, les causes de la pollution deviennent de plus en plus fréquentes. L'exemple précédent montre la diversité et la gravité des conséquences du rejet des effluents en rivière. Les solutions techniques à ce problème existent, nous allons maintenant les détailler.

C - LES REMEDES APPLIQUES

Ils font tous appel à la microbiologie. Les nombreuses espèces microbiennes, aux équipements enzymatiques variés, se prêtent particulièrement bien à la dégradation de substrats très divers contenus dans les eaux usées.

La nature, possédant un sens profond de l'équilibre, contribue efficacement à l'épuration. Les stations d'épuration biologique des eaux rendent possible cette épuration naturelle.

1 - L'épuration naturelle ou auto-épuration des rivières

La nature réagit, lors du déversement d'eaux usées, par le dépôt progressif des matières en suspension et par la dilution des matières organiques dégradables ou oxydables donnant naissance à un état oxydé stable. Tandis que les actions microbiennes, par oxydo-réduction, consomment l'oxygène dissous dans l'eau, une réalimentation en oxygène se produit grâce aux apports d'eaux aérées des affluents, aux échanges gazeux avec l'atmosphère et à la présence de végétaux chlorophylliens. L'oxygène se dissout d'autant plus facilement que le déficit de saturation est plus grand, la température plus basse et la turbulence plus élevée. On peut déterminer le pouvoir auto-épurant d'une rivière en enregistrant, en fonction du temps, la teneur en oxygène dissous. Les différentes valeurs relevées permettent de construire ce que l'on appelle la courbe "en sac" qui résulte elle-même de deux courbes :

- la courbe de consommation de l'oxygène dissous
- la courbe de réabsorption de l'oxygène atmosphérique.

Les facteurs qui modifient les deux composantes (évolution des matières organiques liée à l'activité microbienne, turbulence et débit de l'eau, activité chlorophyllienne et température) déterminent le pouvoir auto-épurant de la rivière.

Les courbes de la figure 1 (second fascicule)* illustrent cette notion. Au temps t, la rivière reçoit un effluent polluant qui consomme l'oxygène dissous suivant la courbe 3. En même temps, l'eau, selon le régime de la rivière, s'aère et s'enrichit à nouveau en oxygène suivant la courbe 2. La teneur en oxygène dissous est alors représentée par la courbe "en sac" 1 dont les ordonnées sont obtenues en faisant la somme des ordonnées des courbes 2 et 3. On remarque qu'au temps t', un nouveau déversement d'effluent peut être fait.

Jusqu'à une époque récente, la nature a été le principal agent épurateur. Actuellement, il est indispensable d'épurer l'eau avant son rejet dans la rivière et de ne laisser à la nature qu'un rôle secondaire. Une fois le pouvoir auto-épurant d'une rivière connu, il est indispensable de préjuger des conséquences d'un rejet d'eaux résiduaires par des études en laboratoire sur le comportement biologique de l'eau à traiter. Le test le plus utilisé est la détermination de la demande biochimique en oxygène (D.B.O.).

Un volume connu de l'effluent est mélangé à un volume également connu d'eau aérée (eau de dilution). L'eau de dilution est enrichie en substances nutritives puis ensemencée avec un faible volume d'eau du milieu récepteur pris très en aval du lieu de déversement. L'oxygène est mesuré avant et après incubation de 5 jours à la température de 20°C. La différence entre les deux résultats, compte tenu de la dilution, exprime la quantité d'oxygène par

*Les figures et les tableaux d'intérêt général ou nécessitant de fréquents renvois constituent le corps du fascicule.

litre nécessaire à l'effluent pour s'auto-épurer dans l'eau de dilution considérée : c'est la D.B.O./5 jours ou $D.B.O._5$. On estime qu'après un délai de 5 jours, l'effluent est arrivé à la mer ou est dilué de telle façon, par les effluents de la rivière, que son action est négligeable.

Les connaissances du pouvoir auto-épurant de la rivière et de sa faune piscicole permettent de fixer le degré d'épuration de l'eau considérée, c'est-à-dire de calculer sa $D.B.O._5$. En reprenant l'exemple cité par CHADEYRON (57) d'une usine déversant 1 000 m3/h d'eaux résiduaires dans une rivière à salmonidés dont le débit est de 20 000 m3 et la teneur en oxygène de 9 mg/l, la $D.B.O._5$ de l'eau résiduaire rejetée devra être inférieure à 40 mg par litre, si l'on prend le cas, défavorable, où la rivière ne s'auto-épure pas.

Il ne suffit pas de déterminer la D.B.O. en 5 jours et de tirer des conclusions sur ce qui se passera en 6, 12 ou 24 heures car la consommation d'oxygène n'est pas proportionnelle au temps. Le plus important est de prévoir les conséquences au cours des premières heures de rejet, l'effluent, par suite, sera plus ou moins dilué. De deux eaux de même $D.B.O._5$, celle qui correspond à la $D.B.O._{24\ h}$ la plus forte sera la plus dangereuse.

Avec de nombreuses eaux résiduaires industrielles renfermant des substances réductrices ou oxydables, la D.B.O. devient inutilisable. On applique alors une nouvelle méthode qui est la demande chimique en oxygène (ou D.C.O.). La D.C.O. représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder chimiquement la totalité des matières organiques (en solution et en suspension) contenue dans un litre d'eau résiduaire. Cette technique donne une réponse rapide (2 à 4 heures).

Notons pour terminer la découverte, en 1963, par STOLP et STARR (212) d'un parasite des bactéries à Gram négatif vivant dans les eaux polluées et contribuant à l'assainissement de ces eaux. Son importance et son rôle ont été discutés en 1968 par BRISOU (33), GUELIN et LEPINE (106) ; ces derniers auteurs ont isolé un nouveau parasite bactérien actif sur les germes à Gram positif des eaux polluées. Ces parasites appartiennent à l'espèce *Bdellovibrio bacteriovorus*.

2 - Les stations d'épuration

Elles peuvent être réparties en deux grandes catégories suivant l'origine, domestique ou industrielle, de l'eau à épurer. Au cours de leurs descriptions, nous insisterons sur les phénomènes microbiologiques.

a - L'épuration des eaux domestiques comprend deux séries de procédés : les procédés physiques (épuration primaire) et les procédés biologiques (épuration secondaire).

- Les procédés physiques d'épuration ont pour but d'éliminer les matières en suspension et se déroulent en quatre phases :

* le dégrillage retient les matières volumineuses en suspension.

* le dessablage retire à l'effluent les particules de matières lourdes qui pourraient occasionner le colmatage des tuyauteries (graviers, sable, éléments minéraux ou inertes).

* le dégraissage et le déshuilage, par flottation et insufflation d'air, éliminent les corps gras dont la présence est à éviter lors de l'épuration biologique.

* la décantation primaire permet de supprimer 90 % des matières en suspension, décantables, présentes dans l'eau. Les boues décantées sont extraites périodiquement.

- Les procédés biologiques d'épuration consistent à provoquer le développement de micro-organismes de façon à minéraliser les matières organiques en solution dans les eaux usées. Les substances carbonées sont transformées en gaz carbonique et en eau, avec formation de produits intermédiaires (acides organiques). Les matières azotées sont dégradées en composés ammoniacaux qui, par la suite, seront oxydés en nitrites et nitrates, l'apparition des nitrates étant considérée comme le terme final de l'épuration biologique. Selon le procédé utilisé, les micro-organismes se rassemblent en films (lits bactériens) ou en masses floconneuses (boues activées).

- *Les lits bactériens* (appelés également filtres bactériens ou filtres percolateurs) ont leur principe fondé sur les expériences de purification des eaux par infiltration dans le sol. On cherche, dans ce procédé, à réaliser artificiellement les meilleures conditions du sol naturel. L'eau à traiter, préalablement décantée, ruisselle de façon discontinue au sommet du lit, sur une masse de matériaux poreux ou caverneux, présentant une grande surface (coke métallurgique, pouzzolanes, cailloux siliceux à angles vifs ...). L'aération est pratiquée le plus souvent par tirage naturel, ce dernier étant créé par différence thermique entre le sommet et la base du lit, quelquefois par ventilation forcée. Elle a pour but d'apporter dans toute la masse du lit l'oxygène nécessaire au maintien en aérobiose de la microflore qui se développe à la surface des matériaux. Au bas de l'installation s'écoule l'eau épurée.

- *Les boues activées.* Les premières expériences par boues activées datent de 1881 et furent entreprises par DUPRE et DIBDIN (144) à Londres, en aérant l'eau d'égoût préalablement décantée. Les résultats furent décevants et repris en 1916 par ARDERN et LOCKETT (10). Ces derniers auteurs aérèrent de l'eau d'égout brute non décantée, jusqu'à complète nitrification, cette opération demande cinq semaines. Le liquide clair est décanté, un nouvel échantillon d'eau brute est déversé sur le dépôt de boues, puis, est aéré de façon à obtenir les mêmes résultats que précédemment. Les opérations sont répétées jusqu'à ce que le temps de nitrification soit réduit à 24 h. On obtient alors la boue activée, le traitement dure au total 70 jours. Ayant accumulé un volume suffisant de boues activées, ARDERN et LOCKETT obtiennent, par aération durant 6 heures, un effluent comparable à celui des lits bactériens les plus efficaces ; la durée de l'aération variant avec la composition des eaux. Ces travaux furent poursuivis aux Etats-Unis par CLARK et BARTOW (144) et en France par DIENERT (75). A partir de 1916, les installations

techniques prirent naissance. Elles comprennent :

* un bassin de décantation pour l'élimination des matières en suspension.

* un bassin d'activation : on provoque le développement de micro-organismes en masses floconneuses ("floc") dans un bassin alimenté en eau à traiter décantée, en brassant la masse et en fournissant l'oxygène nécessaire à la prolifération des germes aérobies. Le brassage et l'oxygénation peuvent se faire soit par barbotage d'air comprimé soit au moyen d'un agitateur mécanique mettant le contenu du bassin au contact de l'air atmosphérique.

* un bassin de décantation secondaire : il permet de séparer l'eau traitée des boues qui, en partie, sont renvoyées dans le bassin d'activation pour en assurer le réensemencement permanent, et en partie extraites vers le traitement des boues.

Les différents systèmes de boues activées peuvent se classer selon l'importance de la charge appliquée et le procédé de brassage et d'oxygénation utilisé.

- *Microbiologie des lits bactériens et des boues activées.*
L'importance du rôle de la nitrification dans les processus de l'épuration biologique par les boues activées a été démontrée, dans les premières décades du siècle, par de nombreux auteurs français et étrangers dont DIENERT (76), ROCHAIX (64), CAVEL (56), ARDERN et LOCKETT (10). Cependant, le caractère biologique de la nitrification fut longtemps méconnu et même contesté notamment par CAMBIER (52) en 1920. Cet auteur invoquait des facteurs purement chimiques attribuant aux sels de fer un rôle catalytique de premier plan dans la formation des nitrites et nitrates. S. et H. WINOGRADSKY écrivaient alors en 1933 (238) : "quant aux boues activées, milieu où la nitrification atteint une énergie impressionnante, on ignore presque tout de leurs agents actifs. Seule une méthode facile et sûre permettra une étude approfondie". Cette méthode, S. WINOGRADSKY l'a créée la même année (238) : elle consiste à utiliser des plaques de silico-gel émaillées de bases carbonatées et de kaolin avec ensemencements par grains de terre. Par cette technique, H. WINOGRADSKY (239-240) entreprend, en 1935, l'étude de la nitrification des boues activées de Paris en employant un échantillon de boues activées en provenance de l'usine de Colombes et fourni par CAMBIER, partisan de la théorie chimique. H.WINOGRADSKY ensemence des plaques de silico-gel émaillées avec 1 ml de boues activées diluées au 1/100ème et obtient d'innombrables colonies confluentes. La richesse en ferments nitreux et nitriques est telle que, pour obtenir des colonies séparées, la dilution d'ensemencement doit être de 10^{-8}. Sept formes de Nitrosobactéries sont isolées, parmi lesquelles *Nitrosomonas* constitués de cellules ellipsoïdales mobiles, isolées ou en courtes chaînes, *Nitrocystis* aux cellules incluses dans une bactérioglée et entourées d'une membrane commune formant kyste et trois espèces nouvelles appartenant à un nouveau genre : *Nitrosogloea* (*N. merismoides*, *N. schizobacteroides* et *N. membranacea*) formées de cellules ellipsoïdales ou allongées noyées dans une bactérioglée mais non entourées de membrane commune. Deux espèces nouvelles de Nitrobactéries sont également mises en évidence : *Nitrocystis sarcinoides* et *Nitrocystis micropunctata*, constituées de bâtonnets droits ou ellipsoïdes réunis en amas compacts

au sein d'une bactérioglée. Selon les termes de H. WINOGRADSKY (240) : "la nature biologique du processus de la nitrification apparaît résolue définitivement".

Reprenant ses travaux sur les boues activées en 1949, H. WINOGRADSKY (241-242) montre, en utilisant des cultures volontairement non pures pour respecter les conditions écologiques du milieu naturel, que les bactéries nitrifiantes sont capables de se développer dans des conditions défavorables (milieu contenant des substances organiques, pression d'oxygène réduite, présence d'hydrogène sulfuré ...). Elle en déduit que "les bactéries nitrifiantes des eaux usées appartiennent à une microflore physiologiquement adaptée à des milieux défavorables et sont protégées par leurs gaines glaireuses contre les substances qui leur seraient toxiques" et met en évidence en 1956 (243), les influences néfastes de la surcharge des eaux usées en matière à épurer et de l'insuffisance de l'aération sur les processus biologiques de nitrification.

A côté de ces travaux fondamentaux sur la nitrification, de nombreux auteurs se sont attachés à identifier les autres espèces composant la microflore des lits bactériens et des boues activées.

JOHNSON (129) remarqua, en 1914, que la partie supérieure des lits où filtrait l'eau à épurer se couvrait rapidement d'une couche visqueuse, mucilagineuse de *Zooglea ramigera*. Cette bactérie, de la famille des Pseudomonadacées, produit des masses bactériogléiques considérables. Elle est à Gram négatif et se présente sous forme de bâtonnets de 4 µ de longueur en agrégats de nombreuses cellules entourées d'une gangue gélatineuse ramifiée. Elle fermente peu les glucides, sa limite inférieure de développement est de 4°C, son optimum se situe entre 20 et 28°C. JOHNSON (129) conclut que *Zooglea ramigera* constitue peut-être l'organisme le plus caractéristique et le plus important de cette zone du lit bactérien. Malgré la mise en évidence du travail microbien, les chercheurs furent souvent en désaccord quant à la nature exacte de la flore bactérienne. Les premiers auteurs dans cette voie estiment que les bactéries sporulées aérobies constituent l'ensemble dominant. Par exemple, RUSSEL et BARTOW (195), en 1916, au cours de leurs travaux sur le traitement des eaux usées, isolent 13 variétés de bactéries dont 4 seulement ne sporulent pas, le reste étant rattaché à *Bacillus subtilis* et à des espèces voisines. Ces recherches sont confirmées par KAMM en 1917 (131). Cependant, d'autres auteurs pensent que certaines espèces de la famille des Enterobactériacées jouent un rôle majeur dans le traitement par boues activées. CLARK et GAGE (1908) (60) identifient *Escherichia coli* et *Aerobacter cloacae* comme micro-organismes prépondérants à la station expérimentale de Lawrence (U.S.A.). Plus tard, en 1927, HARRIS, ANDERSON et COCKBURN (111) arrivent à la conclusion que 61 % des bactéries présentes dans les boues activées appartiennent à l'espèce *Aerobacter aerogenes* et 38 % au genre *Proteus*. Sensiblement, à la même époque, de nombreux travaux mettent en relief l'action de deux bactéries filamenteuses, *Sphaerotilus natans* et *Beggiatoa alba* : BUSWELL et LONG, 1923, (46), GILCREAS, 1927 (98), AGERSBORG et HATFIELD, 1929 (2), BUSWELL, 1928 (44), 1931 (45), TAYLOR, 1930 (222). Ces travaux sont confirmés par HOLTJE, 1943 (117), LACKEY, 1949 (142) et COOKE, 1959 (62).

Jusqu'alors la nature des bactéries à zoogléées était considérée comme hétérogène, BUCHANAN (38), en 1925, note que le nom générique de *Zooglea* est tombé en désuétude. C'est sous l'influence de l'Ecole Américaine de BUTTERFIELD et WATTIE, en 1935, que la thèse ancienne de JOHNSON (129),datant de 1914, est de nouveau mise en lumière. Ces auteurs déclarent que les micro-organismes sécrétant des bactérioglées appartiennent à un genre unique *Zooglea*, microflore dominante des lits bactériens : BUTTERFIELD 1935 (47), BUTTERFIELD, RUCHHOLFT et Mc NAMEE 1937 (48), BUTTERFIELD et WATTIE 1941 (49), WATTIE (237) conclut, en 1943, que "les bactéries des lits bactériens et des boues activées ont été isolées en culture pure et il apparaît que les bactéries formant des zoogléées appartiennent à un seul genre". De nouveau, la querelle reprend. Ces conclusions sont controversées par Mc KINNEY et ses collaborateurs : Mc KINNEY 1952 (150), 1953 (151), 1956 (152), 1957 (153),Mc KINNEY et HORWOOD 1952 (154), Mc KINNEY et WEICHLEIM 1953 (155). Ces auteurs reclassent les bactéries formant une bactérioglée en différents genres et familles et expriment l'opinion qu'une grande diversité de micro-organismes peuvent produire, sous certaines conditions, des sécrétions extra-cellulaires et jugent les critères non satisfaisants pour en faire un seul genre ou famille.En 1963, JAMES (126), dans le but de mettre fin à ces contradictions, entreprend l'étude de la microflore des lits bactériens. Il isole de nombreuses bactéries à Gram négatif appartenant aux genres *Achromobacter, Alcaligenes, Flavobacterium, Pseudomonas* et *Zooglea*. Cet ensemble constitue environ 90 % des espèces isolées. Les résultats de cet auteur ne confirment pas l'importance présumée des espèces coliformes, sporulées aérobies et des bactéries filamenteuses. L'année suivante (1964), ANDERSON (5) identifie,lui aussi,de nombreuses bactéries à Gram négatif parmi lesquelles *Zooglea ramigera, Zooglea filipendula, Nocardia* et *Mycobacterium*. Il remarque que toutes les bactéries produisant un "floc" dégradant le glycérol. ANDERSON (5) signale également la présence de *Sarcina, Micrococcus, Corynebacterium, Streptococcus* et *Aerobacter*. Il émet l'hypothèse que *Zooglea* et les espèces voisines ne dégradent pas les substances complexes, ce rôle étant dévolu aux bactéries ne produisant pas de "floc". Les résultats acquis par JAMES (126) et ANDERSON (5) sont confirmés en 1965 par PAINTER (172), DIAS et BHAT (74). De plus ces derniers auteurs établissent que les parasites *Bdellovibrio bacteriovorus* et les bactériophages ne sont pas actifs pendant le traitement d'épuration. Les publications récentes de KANSKA (1966) (134), de GANN, COLLIER et LAWRENCE en 1968 (81) confirment la grande diversité microbienne des boues activées et des lits bactériens,la famille des Pseudomonadacées étant largement représentée. En 1967, PRAKASAM et DONDERO (183-184) mettent au point des milieux de culture *"in vitro"* contenant des extraits de boues activées permettant d'obtenir de meilleures cultures. KIPP, en 1966 (136), montre la faible utilisation du glucose par *Zooglea* et TEZUKA en 1967 (224) la nécessité de magnésium dans le milieu. Les dernières recherches japonaises (1968) entreprises par KAN KIUCHI, HIROSHI KURAISHI, HARUYOSHI MUROOKA, KO AIDA, TEIJIRO UEMURA (132-133) permettent d'isoler de la boue activée 12 souches de bactéries parmi lesquelles *Pseudomonas stutzeri, Ps. diminuta, Ps. fragi, Achromobacter pestifer, A. superficialis, Flavobacterium lutescens, Brevibacterium ammoniagenes*. Deux espèces citées pour la première fois forment un "floc" en culture pure (*Pseudomonas stutzeri, Alcaligenes faecalis*), au contraire *Pseudomonas diminuta* et *Achromobacter pestifer* inhibent la floculation. Quant aux autres micro-organismes,

ils forment un "floc" en culture mixte. FRIEDMAN et DUGAN (1968) (88)montrent l'importance d'espèces de *Zooglea* et d'autres bactéries (*Pseudomonas denitrificans*).

A cette liste, on doit ajouter la présence de nombreuses levures isolées par COOKE en 1965 (63) : *Cryptococcus, Rhodotorula, Trichosporon, Candida, Torulopsis,* de champignons : *Geotrichum, Fusarium acquaeductum.*

Enfin, une grande variété de protozoaires se nourrissent de bactéries vivant dans les lits bactériens et les boues activées : *Vorticella, Paramecium, Chilodon, Spathidium* (AMIN et GANAPATI 1967) (4) et permettent d'apprécier le degré d'épuration de l'eau (LIEBMANN 1965) (147).

- *Fonctionnement biochimique des lits bactériens et des boues activées.* Le fonctionnement des lits bactériens reste obscur. Les travaux relatifs à ce sujet sont rares et émanent le plus souvent de notes techniques des laboratoires de l'industrie. Les hypothèses et les suppositions prennent le pas sur les faits prouvés expérimentalement. L'utilisation de méthodes empiriques associées à des analyses chimiques permettent de suivre et de diriger les différentes phases de l'épuration.

On a cherché à calculer la durée minimum de contact de l'eau à épurer avec le lit bactérien. Selon DUNBAR, d'après LECLERC (144) en employant 1 m3 de pierraille par m3 d'eau, elle n'est que de 10 à 30 minutes. Il n'est pas question pour des temps aussi brefs d'invoquer un processus biologique, l'auteur conclut à des phénomènes actifs d'adsorption "au niveau des Zoogléés".

De son côté, PONNINGER (181) considère que le lit bactérien est normalement porteur d'une certaine quantité d'eau retenue dans les Zoogléés et entre les pierres. L'alimentation en eau provoque le passage d'un courant qui, au sortir du lit, sera constitué d'un mélange homogène d'eau brute et d'eau suintant entre les zoogléés. En fonction de l'intensité de ce courant, on comprend que les échanges entre zoogléés et courant s'accomplissent plus ou moins vite.

Actuellement, les lits bactériens sont utilisés pour épurer l'eau de petites agglomérations (10 à 30 000 habitants). Deux types de lits sont employés :

* les lits à faible charge : moins de 0,4 m3 d'eau à traiter par m2 de film bactérien et par heure.
* les lits à forte charge : plus de 0,6 m3/m2/h. Le flot d'eau est tel qu'il permet le lavage, l'autocurrage du matériau sur lequel ne subsiste qu'une mince pellicule bactérienne. A la suite des lits bactériens, se trouve un décanteur secondaire. L'eau recyclée peut effectuer un second passage sur le lit.

Le rendement d'un lit bactérien est le suivant : 1 m2 de film détruit, par 24 h., 5 kg de matières organiques. Le débit de l'eau doit être sans excès, ni interruptions prolongées, la qualité relativement constante

(teneur limitée en matières en suspension). De plus en plus, le traitement par boues activées est seul utilisé.

Son fonctionnement demeure également mystérieux. Quatre théories s'affrontent :

* théorie de l'absorption (CAVEL, PARSONS et WILSON) (55).

La boue activée, sous l'influence des frottements, acquiert une charge électrique de signe contraire à celles des micelles colloïdales contenues dans l'eau à épurer. La clarification, par floculation, serait un phénomène d'ordre physique tandis que l'oxydation et la dégradation des matières organiques constitueraient un processus biologique.

* théorie de l'action des protozaires et des bactéries filamenteuses. BUSWELL et LONG (1923)(46) estiment que les matières colloïdales et la boue sont chargées négativement : la floculation ne s'explique plus. Il y aurait succession et addition définies d'espèces à mesure que la boue se forme.

* théorie de la coagulation ou collage (HOROWITZ et WLASSOWA d'après LECLERC)(144) . L'absorption des matières colloïdales par un précipité floconneux serait due aux réactions des sels de fer et d'alumine avec les bicarbonates alcalins et surtout alcalinoterreux.

* théorie de la clarification (DIENERT) (75).

Il y a action exclusive des micro-organismes : "microbes clarifiants et microbes oxydants", vivant en symbiose et en bactérioglées, provoquent "l'agglutination" de la matière organique et son oxydation.

De ces quatre théories, on peut conclure actuellement que le traitement pour boues activées se déroule en deux phases. La première phase est un phénomène physique d'adsorption rapide, la seconde phase consiste en la dégradation biologique des matières adsorbées.

L'épuration par les boues activées se pratique dans les villes de plus de 30 000 habitants. De nombreux facteurs influencent le traitement : température (le processus est fortement ralenti en dessous de 5°C), temps d'aération, proportion des boues activées (15 à 40 % du volume d'eau à épurer), concentration et nature de l'effluent. Quatre heures d'aération permettent la destruction de 20 mg/litre de matières organiques, dans les conditions optima de température et de fonctionnement.

Lits bactériens et boues activées sont les deux principaux traitements utilisés dans l'épuration des eaux d'égout. Intermédiaire entre les lits bactériens et les boues activées, on emploie depuis quelques années le procédé par bio-disques. Le principe fondamental, décrit par SCHMIDT (201), est de cultiver des bactéries aérobies sur une surface mobile tantôt immergée dans l'eau à épurer, tantôt émergée dans l'atmosphère de l'air. Les disques constitués de matière plastique légère et résistante sont alignés sur un axe horizontal. L'ensemble ainsi monté forme un tambour matérialisant plusieurs milliers de m2 de surface. D'autres traitements, de nature chimique , existent (floculation par les sels de fer ou la chaux). Tous les procédés aboutissent à la formation d'une grande quantité de boues qu'il s'agit maintenant de réduire à un volume minimum.

- *La digestion des boues.* Les traitements physiques de décantation, de même que les traitements biologiques aboutissent à la formation d'un résidu : boues primaire et secondaire. Elles constituent un magma extrêmement riche en eau (95 à 99 %), difficilement filtrable et susceptible d'entrer rapidement en putréfaction avec dégagement d'odeurs nauséabondes.Un traitement préalable, avant leur épandage sur le sol ou sur une aire de séchage, est nécessaire : c'est le but de la digestion des boues qui consiste à :

* faciliter la déshydratation de la masse.
* réduire au maximum le volume de la boue.
* la rendre imputrescible.
* valoriser les produits intermédiaires du traitement.

Le traitement biologique le plus communément utilisé est la fermentation méthanique, traitement de digestion anaérobie : il se pratique dans de grandes cuves closes, appelées digesteurs.

La digestion comprend deux phases étudiées par BURBANK, COOKSON, GOEPPNER, BROOMAN et BARKER (40).

* la phase acide : phase de liquéfaction obtenue par hydrolyse, grâce à des enzymes extracellulaires produites par de nombreuses bactéries saprophytes : *Escherichia coli, Pseudomonas denitrificans, Klebsiella, Bacillus knefelkampii, Sarcina cooksoni.*
* la phase de gazéification : les matières organiques sont transformées en acide acétique. En présence de calcium, il y a formation d'acétate de calcium qui se décompose en méthane et gaz carbonique. Le gaz obtenu est un mélange de méthane (60 à 75 %), de gaz carbonique (20 à 35 %) et d'azote provenant de la dénitrification (0 à 5 %). Son pouvoir calorifique avoisine 5 700 kcal/m3 ; le dégagement atteint 950 litres par kg de matière organique détruite. La fermentation méthanique est due à de nombreuses bactéries au métabolisme très spécialisé. Selon BARKER, spécialiste de la fermentation méthanique, on peut citer *Terminosporus omelianskyi, Clostridium propionicum, Ristella soehngeni, Methanococcus (mazei, vanieli, barkii)* et *Sarcina methanica.* Toutes ces espèces sont mésophiles. La fermentation s'effectue à la température de 30 à 35°, pendant 30 jours. On utilise peu les bactéries thermophiles, le produit final ayant une odeur assez forte. Le chauffage des digesteurs est assuré par le gaz biologique produit après démarrage de la fermentation.

Les boues, une fois digérées, sont séchées soit par filtration sous-vide, centrifugation ou passent sur des lits de séchage, formés de couches de sable sur support de machefer drainé. L'épaisseur de la boue est de 30 à 40 cm. Les boues séchées peuvent servir d'engrais : elles renferment 24% de matières organiques, 30 % de matières minérales, 1 % d'azote et 0,7 % d'acide phosphorique. D'autres stations d'épuration les épandent, les enterrent ou les brûlent. Dans quelques cas il y a rejet à la mer.

b - L'épuration biologique des eaux résiduaires de papeterie.

Comme l'a fait remarquer BREBION (25), l'épuration biologique suivant les procédés classiques des boues activées ou des lits bactériens,

conduit pour les eaux résiduaires industrielles, à des résultats décevants. Les causes principales d'échecs sont au nombre de deux :

Quel que soit le procédé employé, l'épuration consiste toujours à faire développer des micro-organismes (bactéries ou champignons) dans un milieu constitué par l'eau résiduaire à épurer. Ce développement n'est possible que si le milieu renferme, en quantité suffisante, les substances carbonées et azotées indispensables à la croissance bactérienne. Dans les eaux usées domestiques, ces conditions existent : les eaux d'égout forment un milieu nutritif facilement biodégradable qu'il s'agisse du pH ou du rapport entre les principaux éléments nutritifs C/N/P/K. Les eaux résiduaires à caractère minéral dominant ne peuvent être épurées que par un traitement chimique, celles à caractère organique sont susceptibles d'être épurées par voie classique. Il en est tout autrement avec les eaux résiduaires de papeterie, au pH fortement basique, et pratiquement carencées en azote et en phosphore. En palliant ces carences sous forme d'adjonctions d'ammoniaque et d'acide phosphorique, les procédés classiques restent utilisables, surtout celui des boues activées dont le rendement demeure supérieur à celui des lits bactériens.

La seconde cause d'échec réside en l'application de méthodes tout à fait empiriques où l'étude des processus microbiologiques n'a été qu'à peine effleurée. La connaissance du rapport D.B.O./D.C.O. est utile. Si ce rapport est égal ou supérieur à 0,6, on considère que l'eau peut être facilement épurée par voie biologique en assurant la présence de micro-organismes susceptibles de dégrader les matières organiques (eaux d'égout). Entre 0,2 et 0,5, des méthodes spéciales sont à appliquer : mise en jeu de micro-organismes spécifiques. Enfin, pour un rapport inférieur à 0,2, l'épuration biologique n'est plus possible.

Etant donné la complexité et l'hétérogénéité des eaux industrielles, nous nous limiterons à l'examen des procédés employés pour le traitement des eaux de papeterie. Ils sont principalement au nombre de trois : le traitement par boues activées avec les réserves signalées, le lagunage aéré et l'épandage par irrigation et infiltration. D'autres solutions sont envisagées à l'échelle du laboratoire : dégradations par actions successives de souches sélectionnées étudiées par BREBION et ses collaborateurs (25 à 31), traitement en mélange avec les eaux d'égout.

- L'épuration par boues activées (ou traitement intensif).

Ce procédé est très utilisé. Les exemples les plus classiques sont, aux Etats-Unis, celui de la station d'épuration de la West Virginia Pulp and Paper Company de Covington (Virginie) et en Europe, celui de la station de la Cellulose des Ardennes (Belgique). Les renseignements techniques qui suivent sont extraits des publications américaines de BURNS et ECKENFELDER (1964) (42) et françaises de DURAND, 1966 (79) et GRIFFE, 1967 (105).

Le traitement est un processus continu qui consiste d'abord :

* à neutraliser les eaux dans un bassin de mélange (durée 20 minutes).

* à éliminer le maximum de matières en suspension par sédimentation dans un décanteur primaire (durée de séjour : 2 h.30).

* à réduire au maximum la D.B.O. par action des boues activées dans une cuve d'aération. Au préalable, l'eau est enrichie en azote,sous forme d'ammoniaque, et en phosphate, sous forme d'acide phosphorique. Les quantités d'azote et de phosphore utilisées sont respectivement de 22 kg et de 4,5 kg par tonne de D.B.O.

Le temps de contact avec les boues activées est de 2 h.30. Celles-ci sont extraites par sédimentation de l'effluent traité biologiquement (décantation secondaire : durée 2 h.). Elles sont en grande partie recyclées ; les boues excédentaires étant minéralisées dans un bassin de stabilisation (48 heures). Les boues de décantations primaire et secondaire sont épaissies puis épandues à des fins agricoles ou brûlées.

Les eaux sont donc épurées en 7 h.30, durée qui nous paraît bien courte pour invoquer la mise en oeuvre de phénomènes biologiques efficaces.A ce sujet, les précisions manquent. La réduction des matières en suspension est de 95 %, la perte de D.B.O. de 2 kg par m3 de bassin d'activation,le rendement atteint 80 à 90 %. Ce même type d'installation équipe les Papeteries de DOWNIGTON (Pensylvannie, U.S.A.), la description datant de 1963 en est faite par PETERS et Mc NEAL (176)

- Le lagunage aéré (ou traitement extensif)

Le procédé d'épuration par lagunage aéré est basé sur le même principe que le traitement par boues activées. Il en diffère uniquement par la plus faible concentration en boues et par la durée de contact beaucoup plus longue. Le lagunage aéré exige l'utilisation de superficies énormes.Son développement a pris naissance dans le Sud des Etats-Unis. En France,sa mise en oeuvre est très rare.

L'exemple classique est fourni par la station d'épuration de Natheola (Alabama), de l'American Can Company et cité par GAY en 1967 (94)

Les eaux résiduaires, neutralisées puis clarifiées dans un décanteur primaire de 80 mètres de diamètre et 5 m de profondeur, sont ensuite aérées dans un bassin de 16 hectares muni de 15 aérateurs (9 sont fixes, 6 flottants) avec apports d'ammoniaque et d'acide phosphorique, de façon à respecter les rapports D.B.O./N/P à 100/5/1. L'eau traitée est ensuite stockée dans un bassin de 44 ha jouant le rôle de décanteur secondaire. Les boues, primaire et secondaire, sont sédimentées dans des bassins totalisant une surface de 10 ha. Le rendement de D.B.O. éliminée est de 60 %.

En France, il existe une station d'épuration par lagunage aéré décrite par GRIFFE en 1967 (105). Cette station se compose de cinq bassins d'une superficie totale de 10 hectares et de 1 m de profondeur moyenne, soit une capacité utile de 100 000 m3. Le débit d'eau brute à traiter est de 300 m3/h, le temps de séjour dans les bassins de 12 à 14 jours. Des ouvrages

permettent le passage de l'eau d'un bassin à l'autre en assurant une certaine aération par ruissellement. Quelques bassins, à titre expérimental,sont équipés d'aérateurs flottants, cependant, l'aération est surtout naturelle. L'azote est ajouté sous forme d'ammoniac liquéfié et le phosphore à l'état de phosphate biammonique. Les résultats obtenus montrent que la D.B.O. éliminée, dans ces conditions, atteint 60 %. La couche de boues formées ne dépasse pas 2 à 3 mm après 2 ans de fonctionnement, ce qui est un indice d'une bonne minéralisation.

Au lagunage aéré, on peut rattacher les étangs de stabilisation, où l'eau est aérée uniquement par échanges gazeux avec l'atmosphère.

Les procédés de traitement par boues activées, par lagunage aéré, possèdent des avantages et des inconvénients.La technique des boues activées est la plus suivie par les industriels qui ne disposent pas des surfaces importantes exigées par le lagunage. Son coût d'exploitation reste élevé ; le problème majeur étant l'élimination des boues excédentaires. En revanche, le lagunage aéré, malgré d'imposantes installations onéreuses, est d'une grande souplesse d'utilisation ; les frais d'entretien étant relativement faibles.

- L'épandage par irrigation et infiltration

Une étude récente (1964)(170) a révélé que 26 usines aux Etats-Unis faisaient l'essai ou pratiquaient l'épandage des effluents par irrigation ou infiltration dans le sol. Dix-sept de ces usines réalisent l'opération à grande échelle. Parmi elles, neuf utilisent des unités de pulvérisation,une l'irrigation par inondation et les autres les étangs d'infiltration ou l'irrigation par fossés. La plupart de ces systèmes ne fonctionnent qu'au moment des conditions de faible débit des cours d'eau, c'est-à-dire pendant l'été.

Le National Council for Stream Improvement a entrepris un travail fondamental sur l'épandage, dont les conclusions sont résumées par BLOSSER et OWENS,1964 (19).

Les eaux déversées doivent avoir un pH compris entre 6,5 et 9. Pour des charges en D.B.O. allant jusqu'à 250 kg/ha/jour, on constate après infiltration, une réduction de 95 % de D.B.O. sans altération de la couverture végétale de surface, ni réduction de perméabilité du sol. En augmentant la charge à 350 kg/ha/j. le rendement diminue et n'atteint plus que 60 à 84 %,la couverture végétale s'altère et meurt, le sol perd de sa perméabilité. Pour des charges plus élevées (500 kg/ha/j.) le rendement baisse encore et les conséquences deviennent désastreuses. La charge optimum se situe à 200 kg/ha/j. sur des sols de 50 cm de profondeur. Le rendement est indépendant de la nature du sol employé.

On remarque aussi une réduction de la coloration des eaux : 99 % de la couleur sont éliminés sur terre argileuse, 65 % sur sable . Une salinité totale élevée de l'eau affecte directement les plantes et les effets nuisibles dans le sol se trouvent liés à la teneur en sodium. La méthode la plus

courante pour exprimer le niveau sodium est le S.A.R. (rapport d'absorption sodium) défini comme étant le rapport de la concentration en sodium à la racine carrée de la concentration moyenne en calcium et magnésium. Des effluents d'un S.A.R. compris entre 4 et 9 peuvent être épandus d'une manière satisfaisante sur la plupart des sols. Des amendements de gypse augmentent le taux d'infiltration.

Ce procédé par irrigation exige un contrôle sévère des nappes d'eaux souterraines, de façon à prévenir toutes contaminations. De nombreux auteurs dont CRAWFORD (66) et GELLMAN (97) citent les applications de l'épandage des eaux résiduaires à la culture de nombreuses céréales. Les rendements à l'hectare sont supérieurs à la normale.

- Autres solutions envisagées

De nombreux travaux français récents : BREBION et PRAT 1963 (31), BREBION 1964 (25), BREBION et CABRIDENC 1965 (26) montrent que l'on peut accélérer la dégradation des matières organiques en ajoutant, à la flore préexistante des eaux, des souches ou des mélanges de souches de micro-organismes sélectionnées pour leurs propriétés particulières. Les souches de provenances les plus diverses (effluents industriels, cours d'eau pollués, vases, terres ...) sont sélectionnées et adaptées progressivement à la métabolisation des substances à dégrader. Les installations d'épuration des eaux résiduaires étant réalisées en plusieurs stades, on devra introduire les souches (ou les mélanges) à une période donnée, de façon à compléter l'action biodégradante de la flore déjà présente. Toujours dans cette voie, et par des techniques similaires, BREBION, CABRIDENC et ROGEON (29) ont étudié, en 1966, l'épuration d'effluents industriels renfermant du phénol. L'emploi de *Pseudomonas, Bacillus, Achromobacter, Flavobacterium, Micrococcus* a permis d'éliminer 99,8 % de composés phénolés (BREBION, CABRIDENC et HURIET 1967) (28). Enfin, en 1968, BREBION et HURIET (30) ont obtenu d'excellents rendements en utilisant les lits bactériens constitués d'un nouveau matériau plastique.

D'autres solutions sont à l'étude, notamment, l'épuration mixte d'effluents urbains et industriels, les eaux domestiques palliant les carences en N et P. Cependant, on peut craindre une régression importante des micro-organismes adaptés à la métabolisation de substances complexes en présence d'aliments faciles à biodégrader. Ce fait est d'ailleurs noté par BREBION, CABRIDENC et ROGEON 1966 (29) : ces auteurs constatent une baisse de rendement dans l'épuration mixte d'effluents phénolés.

Dans l'épuration des eaux résiduaires de papeterie, le véritable problème réside dans la dégradation des composés ligneux fortement bio-résistants et la solution dans la recherche des agents de la ligninolyse.

D - LES AGENTS DE LA LIGNINOLYSE

Jusqu'à ces dernières années, la ligninolyse semblait l'apanage presque exclusif des champignons, de nombreuses études biochimiques leur

furent consacrées au détriment des bactéries dont on envisageait à peine les possibilités de dégradation.

1 - La ligninolyse fongique

Nous rappellerons brièvement l'ensemble des résultats obtenus.La décomposition du bois par les champignons s'effectue de deux façons classiquement décrites sous les noms de "pourriture brune" et "pourriture blanche".La pourriture brune consiste en une dégradation préférentielle de la cellulose et des autres glucides ; la lignine demeurant chimiquement inchangée, le résidu prend progressivement une teinte brune. Les champignons responsables de la pourriture blanche décomposent tous les éléments du bois y compris la lignine mais n'attaquent pas la cellulose qui subsiste sous l'aspect de taches blanches. Tous ces champignons appartiennent à l'ordre des Basidiomycètes. Selon MANGENOT (157), l'humidité apparait comme un facteur important dont les valeurs moyennes de 70 % favorisent le développement *in vitro* des agents de la pourriture blanche confrontés à une microflore tellurique et facilitent le clivage de la lignine (1966). La vitesse de décomposition du bois est également proportionnelle à la richesse en azote du milieu mais dépend de la nature de la source azotée. Dans le sol, l'azote organique élimine les agents de la pourriture blanche tandis que l'azote minéral ne semble pas nuire aux aptitudes compétitives de ces derniers (MANGENOT et REYMOND, 1963) (158). Ces mêmes auteurs ont également montré que la richesse en aliments glucidiques était susceptible d'entraver, *in vitro*, la décomposition de la lignine.

Les espèces ligninolytiques, c'est-à-dire l'ensemble des pourritures blanches, élaborent des enzymes extracellulaires (phénoloxydases)consistant au moins en deux enzymes nommées tyrosinase et laccase. Toutes deux sont des protéines renfermant du cuivre et catalysent l'oxydation directe des phénols (mono, di et polyhydrophénols) en quinones, en présence d'oxygène atmosphérique.

Sur lignine isolée artificiellement constituant l'unique source de carbone dans le milieu, *Polyporus abietinus* et *Poria subacida* se développent de façon satisfaisante après une période d'adaptation (DAY et collaborateurs 1949) (70), *Polyporus versicolor* sans adaptation préalable (GOTTLIEB, DAY et PELCZAR 1950) (101-102). ISHIKAWA, SCHUBERT et NORD en 1962 (122-123) constatent que les micro-organismes riches en phénoloxydases (*Polyporus versicolor, Polyporus hirsutus, Poria subacida* J. 247) donnent sur milieu supplémenté en lignines de pin et de sapin, de meilleures cultures que les champignons pauvres en ces mêmes enzymes (*Poria subacida* N 199, *Fomes fomentarius, Fomes annosus, Trametes pini*). La dégradation de la lignine varie proportionnellement à la teneur en phénoloxydase et l'agitation du milieu, donc l'aération, favorise la croissance des champignons.

En 1963, les mêmes auteurs (124) adaptent *Fomes fomentarius* et *Collybia velutipes* à la dégradation de la lignine pendant une période prolongée et remarquent que les teneurs en groupements méthoxyles et en vanilline diminuent au fur et à mesure de l'attaque, tandis que les groupements phénoliques hydroxylés augmentent.

Un nombre limité de produits intermédiaires de la dégradation fongique de la lignine a été identifié.

* acide vanillique, acide syringique (HENDERSON 1955) (112), acide para-hydroxybenzoïque, acide férulique, acide para-hydroxycinnamique (ISHIKAWA, SCHUBERT et NORD 1962) (122), acide 3-méthoxy-4-hydroxyphénolypyruvique (FUKUZUMI 1960) (89).

* coniféraldéhyde, vanilline, aldéhyde syringique (HIGUCHI 1955) (115), aldéhyde para-hydroxycinnamique (ISHIKAWA et coll. 1962) (122).

* guiacylglycerol et son ester β-conifèrylique (FUKUZUMI 1960) (89).

La majorité de ces substances se retrouvent dans les cultures de *Fomes fomentarius, Poria subacida, Trametes pini*, en présence de lignine (ISHIKAWA, SCHUBERT et NORD 1962) (122-123-124). A l'exception des acides para-hydroxybenzoïque et para-hydroxycinnamique, tous ces composés proviennent de l'action d'enzymes fongiques.

2 - La ligninolyse bactérienne

Les connaissance sur la dégradation de la lignine par les bactéries sont beaucoup plus vagues et les différents résultats obtenus, surtout par les anciens auteurs, ont donné lieu à de nombreuses controverses quant à leur interprétation. Les premiers travaux cités datent de 1930 et ce n'est que depuis 10 ans que cette question est vraiment à l'étude.

Les premières recherches sont effectuées sur la lignine "*in situ*". En 1930, PHILLIPS, WEIHE et SMITH (177) obtiennent en aérobiose une dégradation de 48 % de la lignine. BORUFF et BUSWELL en 1934 (28), par la voie anaérobie, signalent une dégradation de l'ordre de 52 %, ce dernier fait étant contredit l'année suivante par LEVINE (146). VIRTANEN et HUKKI (234), cultivant une microflore aérobie thermophile (température de 60°), mettent en évidence la ligninolyse (11 %) accompagnée de la dégradation de la cellulose (67 %) et de pentosanes (85 %) (1946). De toutes ces expérimentations, aucune espèce n'est isolée ni décrite et les cultures sont des mélanges de bactéries.

Les études les plus nombreuses portent sur des lignines isolées de différents bois. En 1931, WAKSMAN (235) utilise la lignine extraite de paille de blé et après incubation pendant 48 heures avec un *Actinomyces sp.* obtient une dégradation de 4 %. Presque à la même époque, en 1932, DEMME (72) analyse l'action de nombreuses bactéries sur des alcali-lignines et met en évidence leurs dégradations. Tous ces travaux ont peu de retentissements et des doutes sont émis quant à une ligninolyse réelle. La première expérimentation incontestée est celle d'ERIKSON (81) en 1941. Cet auteur, à partir de boues du Lac Mendota (WISCONSIN, U.S.A.), isole une dizaine de souches de *Micromonospora chalcea*, bactérie appartenant au sous-embranchement *Mycobacteria* (ordre Actinobactériales, famille Streptomycetacées). Cette espèce dégrade la lignine de sapin en six semaines. Elle est également cellulolytique,

chitinolytique et assimile des substances telles que le phénol, le résorcinol, la paraffine, la caféine ... FISCHER et collaborateurs (186) isolent en 1954, un *Achromobacter* et *Pseudomonas fluorescens* dans les sols et montrent leurs actions positives sur la destruction du lignosulfonate de calcium, des alcali-lignines, avec des taux de dégradation de l'ordre de 75 %.Les cultures mixtes sont plus actives et la ligninolyse atteint 91 %. Ces bactéries sont toutes aérobies et il paraît y avoir une spécialisation due peut-être à une adaptation.En effet, les auteurs constatent, par exemple, que des bactéries, isolées du sol de pinèdes, dégradent de façon sélective les lignines de pin. PREVOT, RAYNAUD, FISCHER et BIZZINI (187), en 1954, démontrent par l'usage de techniques manométriques, l'attaque de la lignine par des bactéries appartenant toutes à la famille des Pseudomonadacées,toutes identifiées et consommant beaucoup d'oxygène. Ils concluent que la ligninolyse semble être le fait d'enzymes adaptativeset les stades intermédiaires sont en partie entrevus. Deux ans plus tard, les mêmes auteurs infirment leurs résultats (188)et prouvent que la lignine n'est qu'adsorbée sur le corps bactérien sans aucune destruction. Cette lignine fixée peut être dissoute par l'acétate d'éthyle à chaud. On ne peut donc plus parler de ligninolyse. Le fait important à noter est que *Pseudomonas* soit une des rares bactéries à être capable d'une telle adsorption et ce phénomène ne se produit parfois seulement qu'après adaptation préalable, par exemple à la suite du contact avec un corps précurseur de la lignine.

HIGUCHI, KAVAMURA et HAYASCHI (116), en 1956, démontrent la dégradation de la lignine native de Brauns sous l'action de *Pseudomonas fluorescens*, de même que SÖRENSEN (211) sous l'action de *Flavobacterium* (1962). DAVEY et TURNER (69) isolent trois souches de *Pseudomonas* décomposant le phénol et certains composés aromatiques. En 1962, un groupe d'auteurs scandinaves dont SUNDMAN (214,215, 217, 220 et 221) identifie l'acide isovanillique comme produit intermédiaire de décomposition de l'α-conidendrine sous l'action d'*Agrobacterium* (216). JASCHHOF (127), en 1965, isole, à partir de lignite, des espèces de *Xanthomonas* et *Micrococcus*, susceptibles de décomposer les alcali-lignines de paille de blé.Le milieu de culture renferme 0,2 % de lignine comme seule source de carbone et une source d'azote protéique. Le taux de dégradation faible (4 %) au bout de 100 jours de culture est porté à 7 % en utilisant des mélanges de différentes souches de *Micrococcus*.

WOODARD, SPROUL et ATKINS (244) expérimentent sur les eaux résiduaires d'usines de pâtes et papier (1964). L'ensemencement est fourni par l'eau de la rivière dans laquelle sont déversées les eaux usées depuis de nombreuses années. Par adaptation, c'est-à-dire, en diminuant progressivement la teneur en glucose et en élevant celle en lignine (0,2 %), ils obtiennent, en 90 jours, une croissance faible et très lente de micro-organismes tels que *Leptothrix ochracea, Pseudomonas multistreata* et *Flavobactérium*. Le dosage de la lignine s'effectue par spectrophotométrie en Ultra Violet et à l'aide du test colorimétrique de Folin-Denis (9).

Tels sont à l'heure actuelle, les résultats obtenus pour la ligninolyse bactérienne. Il est curieux de constater que, comme le fait remarquer POCHON (180), "les bactéries ne sont pas mise en évidence dans le bois

de décomposition où elles pourraient être nombreuses. On ignore tout de l'activité réelle au sein du sol des espèces fongiques et bactériennes, y a-t-il association, antagonisme ?". De toute façon, la ligninolyse est toujours un phénomène lent et de ce fait, il résulte que la lignine a tendance à s'accumuler et se trouve ainsi disponible pour servir de base à la formation de complexe humiques (171).

Tous les procédés biologiques de traitement des eaux usées (domestiques et industrielles), actuellement employés, tendant à reproduire les phénomènes naturels en les accélérant mais ne permettent d'obtenir qu'une épuration partielle des substances facilement biodégradables. Une des raisons principales s'en trouve dans le fait que les énormes volumes d'eau à traiter imposent des temps de séjour très brefs dans les stations d'épuration. Par la diversité des phénomènes biologiques d'origine végétale et animale qu'elle met en jeu, l'épuration naturelle a parfaitement rempli son rôle tant que la charge de pollution des milieux récepteurs n'a pas été excessive. Indispensables à notre époque de civilisation industrielle, les remèdes appliqués à la pollution des eaux ont pour unique objectif de rendre possible et de favoriser l'action de la nature ; en aucun cas, ils ne peuvent la remplacer.

TECHNIQUES GENERALES

et

METHODES D'ETUDE

Depuis sa création, en 1959, la station d'épuration a subi de nombreuses modifications mettant en oeuvre différents procédés d'épandage de mieux en mieux adaptés à l'élimination et à l'épuration des liqueurs noires. La description de ces procédés et les données quantitatives d'eaux épandues constitueront l'ensemble des techniques d'épandage. La seconde partie, consacrée plus particulièrement à l'exposé des méthodes d'étude physico-chimiques et microbiologiques des eaux après infiltration dans le sol, relatera également le protocole expérimental permettant d'apprécier la dégradation des composés ligneux par les micro-organismes.

A - TECHNIQUES D'EPANDAGE

L'usine de la Cellulose du Pin, désireuse d'éliminer la fraction de l'effluent industriel responsable du développement bactérien en rivière, a été amenée à tenter l'épuration par épandage sur un terrain dont la surface peut être facilement remodelée. D'une superficie de 27 hectares et 23 ares, les terres destinées à recevoir les eaux appartiennent à la commune du Teich et figurent sur les plans cadastraux sous le nom de "Landes de la Berle du Tchan".

La couverture végétale de cette région se compose de résineux, de chênes, bruyères, fougères et ajoncs caractéristiques de la Lande atlantique. Les débris végétaux fortement lignifiés, à décomposition rendue difficile par la présence de la roche mère siliceuse très acide (pH 4 à 4,5), donnent naissance à un horizon A_0 d'accumulation de matière organique, épais, mal aéré, de structure fibreuse ayant entre 5 et 20 cm d'épaisseur (figure 2) L'humification et la minéralisation, s'effectuant très lentement, aboutissent à la formation d'un horizon A_1 humifère de 2 à 5 cm d'épaisseur, à rapport C/N très élevé variant entre 20 et 30. L'humus formé, du type mor ou

humus brut, est constitué par une proportion importante de composés fulviques solubles et de complexes humo-ligniques pauvres en azote et difficilement floculables. Le mor se mélange lentement et difficilement au sol et a une forte tendance à migrer. On peut constater que les eaux de drainage naturel des sols de cette région sont souvent colorées en brun par la présence de matière organique. Les substances migratrices, après avoir traversé l'horizon éluvial A_2, de nature sableuse, s'accumulent dans l'horizon B_1 sous forme d'humus et dans l'horizon B_2 sous forme de sels de fer. Ces substances précipitables,à l'état plus ou moins diffus, peuvent durcir et agglomérer les autres éléments du sol. Elles constituent alors le ciment de véritables bancs rocheux, généralement vacuolaires, dénommé Orstein. Dans cette région des Landes, les composés du fer jouent ce rôle et donnent naissance à l'alios, sorte de grès sableux à ciment ferrugineux, les deux horizons illuviaux B_1 et B_2 étant dénommés couramment "alios noir" et "alios jaune". La profondeur de ces horizons varie de 30 cm à 1 mètre. Le profil du sol se termine par l'horizon C formé par le sable de la roche mère, surmontant une couche de sable argileux située entre 8 et 10 m de profondeur draînant les eaux naturelles.

Le problème industriel consiste à épandre sur ce sol 150 à 200 m3/h d'eaux résiduaires. En se référant aux premières études expérimentales des ingénieurs de l'usine, entreprises sur une surface de 10 m2, le régime de déversement admis est de l'ordre de 2 l/m2/h. Il faudrait donc, théoriquement, disposer d'une superficie de 7,5 à 10 hectares.

M. le Professeur SCHOELLER, professeur de Géologie et d'Hydrogéologie à la Faculté des sciences de Bordeaux, a étudié les phénomènes physiques d'infiltration. Les calculs effectués permettent d'affirmer que d'après la nature du terrain et sa pente, il sera impossible de faire absorber un volume de 150 à 200 m3/h d'eau résiduaire. En vue d'améliorer cette filtration, deux solutions sont préconisées :

a) épandre l'eau dans un canal creusé jusqu'à la nappe (ou très près) et disposer à une certaine distance de celui-ci une tranchée descendant également jusqu'au niveau de la nappe et fonctionnant comme drain. Pendant le trajet d'infiltration dans le sable, à partir du canal jusqu'à leur réapparition dans le drain, les eaux doivent s'épurer. Collectées dans un fossé,elles seront ensuite évacuées vers l'Eyre.

b) faire infiltrer l'eau verticalement jusqu'à la nappe et ensuite y pomper un volume d'eau identique à celui que l'on a fait infiltrer. Cette opération présente l'inconvénient majeur de polluer la nappe phréatique, aussi la solution "a" a été choisie et nous allons maintenant décrire les caractéristiques techniques de ce dispositif.

1 - Les différents procédés utilisés

a) Canaux d'infiltration et drains

L'ensemble de l'épandage comporte trois canaux d'infiltration et quatre drains de 500 m de longueur, disposés parallèlement dans la

direction Est-Ouest. Les canaux et les drains, distants d'une quinzaine de mètres, ont à l'origine 4 m de largeur et 2,5 m de profondeur, profondeur différente de celle prévue initialement. La capacité utile de l'ensemble atteint 35 000 m3, la superficie est de 6 hectares. Une conduite en acier de 32 cm de diamètre venant de l'usine assure l'apport d'eaux résiduaires dans les trois canaux. Les eaux filtrées et épurées recueillies dans les quatre drains sont rejetées dans l'Eyre par un collecteur général. La figure 3 schématise l'ensemble de ce dispositif d'épandage.

La mise en service a lieu le 20 août 1959. Au cours des premiers mois, on constate que les dispositions prises se révèlent insuffisantes pour absorber le volume déversé, la distance séparant drains et canaux étant trop faible. Les eaux recueillies dans les drains et remises en circulation se montrent encore susceptibles de provoquer une prolifération bactérienne : les eaux colorées dégagent une forte odeur d'hydrogène sulfuré à la sortie du collecteur général.

Ce premier mode d'épuration apparaît donc inefficace. La durée de cheminement des eaux dans le sol étant trop brève, l'épuration n'a pas le temps de s'opérer. De plus, vu le profil abrupt des drains, les frais d'entretien s'avèrent élevés. Toutes ces constatations entraînent les techniciers de l'usine à modifier le drain 4 (drain Nord), dans le but de faciliter l'élimination de l'eau de la nappe sous-jacente : la largeur du drain est portée à 8 mètres. Les résultats ne sont pas plus satisfaisants. Pour tenter d'utiliser le dispositif onéreux mis en place, on décide d'adopter la solution "b" de Monsieur le Professeur SCHOELLER, mais sans pompage de la nappe.Les drains sont obturés à leur extrémité Est, le collecteur général isolé et une communication relie drains et canaux à l'Ouest. La figure 4 illustre ces nouvelles dispositions. Les eaux résiduaires sont déversées indistinctement dans canaux et drains : elles doivent disparaître par infiltration dans les sables.L'alimentation de l'ensemble débute le 15 novembre 1959, le niveau des eaux est maintenu constant à 20 cm du sol.

Au cours des années et particulièrement en 1963, on note une forte diminution du taux d'infiltration, le fond des canaux se tapisse de fibres de cellulose prenant l'aspect de pâte. L'entretien malaisé des canaux et les frais élevés motivent de nouvelles modifications.

b) Bassins d'infiltration

L'utilisation du procédé d'épandage par canaux dure jusqu'au mois de juillet 1964. A cette date, le terrain est transformé en deux bassins égaux, de un mètre de profondeur, totalisant 5 hectares de superficie (figure 5). Les anciens canaux sont supprimés, seul le drain 4 à l'extrémité Nord est conservé pour raison de sécurité ; il ne reçoit pas d'eaux résiduaires mais recueille les eaux filtrées. La capacité totale des bassins, pouvant être mis en service alternativement lors des nettoyages, atteint 50 000 m3.

c) Epandage par irrigation

Sur un terrain de la commune de Facture, au lieu dit "Forêt du Nézer", une étendue de 32 hectares et 42 ares plantée de pins est divisée en quatre parcelles. Dans chaque parcelle, 25 canaux, de 400 m de longueur, de 0,40 m de largeur et 0,30 m de profondeur, creusés par un soc de charrue peuvent recevoir les eaux résiduaires par déversement à une de leur extrémité. Par un système de vannes au niveau de la conduite principale, il est possible d'irriguer chacune des parcelles isolément. Ce procédé inauguré en avril 1967 est représenté sur la figure 6. Il ne remplace pas le précédent mode d'épandage mais le complète. L'étude microbiologique des terres soumises à l'irrigation a été entreprise par Mlle BERNIAC (15).

2 - Les volumes d'eau résiduaire éliminés par épandage

Les débits mensuels d'effluents, exprimés en m3, figurent dans le tableau n° 1.

Pendant l'année 1959, du mois d'août au mois de décembre, 300 000 m3 d'eaux sont infiltrés dans le sol avec un maximum en octobre.L'année suivante, le volume total éliminé demeure du même ordre de grandeur.Cependant, on constate d'avril à juillet un ralentissement de l'infiltration limitant les apports d'effluents. A partir du mois d'août 1960, la pratique de l'épandage doit être suspendue : les liquides ne filtrent plus dans le sol. Après un arrêt de quatre mois, les envois d'eaux résiduaires reprennent au mois de décembre. Le sol a retrouvé sa perméabilité initiale : les volumes d'eaux infiltrés le prouvent : 390 000 m3 en 1961, 510 000 m3 en 1962.En revanche, de nouvelles difficultés surgissent l'année suivante où l'on ne peut faire infiltrer plus de 90 000 m3. Pour les raisons exposées plus haut, la transformation des canaux et des drains s'impose. Les deux nouveaux bassins d'infiltration entrent en service au mois de juillet 1964. Au cours de la même année, près de 365 000 m3 sont infiltrés dans le sol, contre 210 000 m3 en 1965 et 360 000 m3 en 1966. Ces valeurs sont largement dépassées en 1967 (750 000 m3), en 1968 (450 000 m3) et en 1969 (540 000 m3).

A partir de l'année 1967, s'ajoute l'irrigation des semis de pin à la Forêt du Nézer. D'avril à octobre 1967, le volume d'eaux répandu atteint 520 000 m3. En 1968, il est nettement moins élevé (140 000 m3), l'irrigation n'ayant débutée tardivement qu'en juillet, mais est accru en 1969 (340 000 m3).

B - METHODES D'ETUDE

Elles comprennent l'ensemble des techniques physico-chimiques destinées à l'étude des eaux infiltrées et les méthodes microbiologiques permettant de juger de l'importance et du déroulement des processus d'épuration.

1 - Examen des eaux infiltrées

Le procédé d'épandage utilisé, malgré ses avantages, demande une surveillance étroite et constante des conditions dans lesquelles s'effectue l'épuration. Il s'agit de suivre dans le sol le cheminement du mélange d'eaux résiduaires et surtout d'étudier les variations physico-chimiques et microbiologiques de ces eaux en profondeur. C'est pour permettre une telle étude que fut creusé, au Nord des canaux d'infiltration, dans le sens d'écoulement des eaux et dans toutes les directions, un grand nombre de puits à des profondeurs différentes destinés à effectuer les prélèvements d'échantillons.

a) Prélèvements

Les puits suivent deux directions principales et ont été creusés à mesure, suivant les besoins (figure 5). Leur répartition obéit ou non à certaines normes codifiées :

- une direction approximativement Sud-Nord selon plusieurs lignes parallèles et distantes les unes des autres d'environ 100 m.
  Lignes 9 - 7 - 3 - 5 - 2
  (entre les lignes 5 et 2, fut ajoutée la ligne 1).

- une direction Est-Ouest, toujours selon des lignes parallèles séparées par environ 80 m.
  Lignes B, C, D, E, F.

L'ensemble de ces lignes réalise grossièrement une sorte de quadrillage dont certains croisements sont occupés par un puits foré entre 7 et 10 m de profondeur (figures 4 et 5).

Entre cet ensemble et le dernier canal Nord se trouvent d'autres puits :

- à 20 m du drain 4, on rencontre les puits 11, 7 et 5 situés respectivement à l'extrémité Ouest, au milieu du terrain et à l'extrémité Est, leur profondeur atteint 3 mètres.

- à 20 m, au Nord du puits 7, sont groupés les puits 18, 18 bis et 18 ter respectivement de 10, 8 et 6 m de profondeur.

En outre, il existe de nombreux puits de surveillance creusés en dehors des limites du terrain d'épandage : à l'Est, les puits F6, F7, F8, 3E et 4E, à l'Ouest les puits F1 à F5, F12 et F13, au Sud le puits F11.

Au total, 36 puits ont été creusés pour l'étude et la surveillance du cheminement souterrain des eaux résiduaires. Les prélèvements s'effectue une fois par semaine de 1959 à 1964, puis une fois par quinzaine en 1965 et à intervalles plus espacés les années suivantes. La veille de la prise d'échantillon, les puits sont vidés à l'aide d'une pompe portative, afin de

ne pas recueillir l'eau ayant stagné dans le puits mais le liquide du sol.Le jour du prélèvement, on rejette les premières eaux pompées de façon à rincer les canalisations. Le liquide prélevé est réparti d'une part, dans des flacons stériles de 125 ml en vue de l'étude microbiologique, d'autre part,dans des bocaux de 1 litre pour examen chimique. De retour au Laboratoire,les échantillons doivent être analysés le plus rapidement possible, c'est-à-dire dans les heures qui suivent le prélèvement.

b) Analyse physico-chimique

Elle comprend l'analyse physique du pH, de la coloration et l'examen chimique consiste dans les dosages de demande chimique en oxygène (D.C.O.), d'azote et de sodium.

- pH :

La mesure est obtenue à l'aide d'un pH mètre électronique à électrode de verre (électrode de mesure)et électrode de référence au calomel.

- Coloration :

Une eau présente deux sortes de coloration : une coloration dite vraie ou réelle due uniquement aux substances en solution et une coloration apparente quand les matières en suspension y ajoutent leur propre coloration. Nous nous sommes tenu à l'appréciation de la coloration réelle, après centrifugation de l'échantillon à 5 000 g pendant 20 minutes.

Les eaux résiduaires très fortement teintées rendent très délicates, sinon impossible, l'emploi de la méthode au platine cobalt homologuée par l'Association Française de Normalisation (n° NF T 90 002) ou de la méthode par comparaison avec des disques colorés. Au début de nos recherches,nous nous sommes servis de la gamme étalon utilisée par la "Cellulose du Pin".Par définition, l'indice 100 représente la coloration de l'eau distillée renfermant 18,1 ‰, en volume, de lessive noire Kamyr. Les mesures d'indice de coloration sont obtenues par passage au spectrophotomètre à 8 500 Å de longueur d'onde, de la gamme étalon et des échantillons à analyser. On a pu remarquer que l'indice 100 correspond à 20 divisions de l'échelle de lecture du spectrophotomètre. Par raison de commodité, mais aussi à cause de son manque de reproductibilité, nous avons abandonné la gamme de l'usine pour conserver uniquement les mesures faites à l'aide du spectrophotomètre.

Les liquides très colorés sont examinés à 8 500 Å de longueur d'onde, les eaux peu colorées à 5 500 Å.

- Demande chimique en oxygène (D.C.O.)

La demande chimique en oxygène d'une eau (en abrégé D.C.O.) représente le nombre de milligrammes d'oxygène nécessaires pour oxyder totalement les matières organiques contenues dans l'eau. Le principe de cette mesure

consiste à oxyder, en milieu sulfurique, un volume déterminé d'eau résiduaire. Le dosage par un corps réducteur, généralement le sel de Mohr, indique la quantité de liqueur oxydante consommée. De nombreuses méthodes de dosage de l'oxydabilité, toutes basées sur le même principe, existent : oxydation par le permanganate de potassium, par le sulfate de cérium cérique ou par le bichromate de potassium.

- La méthode au permanganate de potassium peut se pratiquer à froid ou à chaud, seuls les temps de contact de l'échantillon avec la liqueur oxydante diffèrent.

* l'oxydation à froid fut pendant longtemps la méthode employée officiellement dans l'analyse des eaux usées. L'eau est laissée en contact avec un volume connu d'une solution de permanganate titrée. L'excès de permanganate est dosé au bout de quatre heures.

On introduit dans une fiole d'Erlenmeyer 50 ml d'eau à analyser puis 5 ml d'acide sulfurique au 1/2 et 50 ml de solution de permanganate de potassium N/10. On abandonne le flacon pendant quatre heures à la température ambiante du laboratoire puis on décolore par 10 ml de solution de sel de Mohr et l'on tire l'excès de sel réducteur à l'aide de la solution de permanganate N/10.Un ml de Mn O_4K N/10 consommé correspond à 0,8 mg d'O_2. Par le calcul,on détermine la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation des matières organiques contenues dans un litre d'eau. Un essai témoin est indispensable.

* oxydation à chaud. On opère sur 200 ml d'eau à analyser placés dans une fiole d'Erlenmeyer de 1 litre auxquels on ajoute 5 ml d'acide sulfurique pur et concentré et 20 ml de Mn O_4K N/10. On porte à ébullition pendant 10 mn exactement. La liqueur doit rester colorée en rose, sinon on diminue la prise d'échantillon et l'on complète à 200 ml avec de l'eau distillée.On refroidit le plus rapidement possible sous l'eau et l'on ajoute 20 ml d'acide oxalique N/10. On titre par Mn O_4K N/10 jusqu'à obtention de la coloration rose. Comme précédemment, 1 ml de Mn O_4 K N/10 correspond à 0,8 mg O_2.

A côté de ces méthodes en milieu acide, il existe également un procédé d'oxydation à chaud en milieu alcalin (bicarbonate de sodium)très peu usité d'ailleurs.

- La méthode au sulfate cérique présente des avantages sur celle au permanganate de potassium couramment utilisée pour les dosages d'oxydo-réduction, comme l'a précisé LECOQ en 1956 (145) en adaptant la cérimétrie à l'analyse des eaux. Les solutions de sulfate cérique sont plus stables et on peut les utiliser très diluées jusqu'à N/500, le virage étant facilement appréciable grâce à la ferroïne (ortho-phénanthroline ferreuse)indicateur redox, rouge en milieu réducteur et bleu en milieu oxydant.Une série d'essais a été réalisée afin de déterminer l'influence du temps de chauffage sur la quantité d'oxydant consommée. Cette quantité augmente avec la durée de l'ébullition mais à partir de 20 minutes les valeurs de sulfate cérique

consommé sont identiques. Les résultats sont beaucoup plus constants que ceux obtenus avec le permanganate.

L'ensemble de ces raisons nous a amené à choisir la méthode au sulfate cérique pour les dosages d'oxydabilité.

Le réactif de base, le sulfate cérique, s'obtient de la façon suivante. On prépare une solution N/8 en dissolvant peu à peu 50,5 g de sulfate cérique dans de l'eau distillée bouillie additionnée de 160 ml d'acide sulfurique pur et concentré. Après dissolution totale, on complète au litre avec de l'eau distillée. La solution obtenue est diluée à N/16 avec de l'eau distillée dégazée par ébullition et acidulée à 3 % à l'aide d'acide sulfurique pur et concentré. Son titre est vérifié à l'aide d'une solution étalon de sel de Mohr N/16.

Le titre en oxygène de la solution cérique N/16 se calcule de la façon suivante :

$$2\ (SO_4)_2\ Ce \longrightarrow (SO_4)_3\ Ce_2 + SO_3 + O$$

1 litre de solution N de $(SO_4)_2$ Ce correspond à $\frac{16}{2}$ g = 8 g d'O_2

Le titre en oxygène de la solution N/16 est donc de 0,5 mg.

A 5 ml d'eau résiduaire contenus dans un ballon rodé, on ajoute 3 ml d'acide sulfurique pur et concentré puis 25 ml de solution cérique N/16. Le ballon surmonté d'une colonne jouant le rôle de réfrigérant à reflux est porté à ébullition pendant 30 minutes. Passé ce temps, le liquide est refroidi sous courant d'eau et l'on ajoute deux gouttes de ferroïne, indicateur redox, obtenu en dissolvant 1,485 g de monohydrate 1-10-ortho-phénanthroline en présence de 0,7 g de SO_4 Fe, 7 H_2 O, dans 100 ml d'eau. On titre l'excès d'oxydant à l'aide de la solution de sel de Mohr N/16. Le virage du bleu (milieu oxydant) au rouge (milieu réducteur) se voit parfaitement.

Pour certaines eaux dont l'oxydabilité est très faible, le dosage a été effectué à partir d'une prise d'échantillon plus élevée allant jusqu'à 200 ml d'eaux concentrées par chauffage en présence de 6 ml d'acide sulfurique. Les calculs tiennent évidemment compte de ces modifications.

- La méthode au bichromate de potassium est actuellement de plus en plus recommandée et préconisée notamment par l'American Society for Testing materials (A.S.T.M.) et par l'AFNOR (T 90 101 mai 1968). Afin de garder un caractère de continuité à nos résultats, nous avons conservé la méthode au sulfate cérique ; cependant, pour compléter le tour d'horizon des techniques d'oxydabilité, nous décrirons cette nouvelle méthode (méthode A.S.T.M. D 1253-60).

Les composés organiques et inorganiques présents dans les eaux résiduaires sont oxydés par une solution de bichromate de potassium en milieu sulfurique. L'excès de bichromate est alors titré à l'aide d'une solution standard de sel de Mohr, en présence de ferroïne comme indicateur de virage.

Dans un ballon de 500 ml à col rodé, on introduit 25 ml de bichromate de potassium N/4 et 75 ml d'acide sulfurique R.P. On refroidit et l'on verse 50 ml d'eau à analyser (ou une fraction aliquote diluée à 50 ml avec de l'eau distillée). Pour réaliser une oxydation maximum, on emploie comme catalyseur le sulfate d'argent directement ajouté à ce mélange à la dose de 1 g. Après homogénéisation soigneuse du mélange, on ajoute des billes de verre pour régulariser l'ébullition et l'on relie le ballon à un réfrigérant à reflux de FRIEDRICHS à extrémité rodée. On maintient l'ébullition pendant deux heures. Après refroidissement du ballon, on lave le condenseur avec 25 ml d'eau distillée et on dilue la solution acide à 350 ml avec la même eau puis on laisse de nouveau refroidir. L'excès de bichromate est titré avec la solution de sel de Mohr N/4 en présence de ferroïne.

Suivant le même protocole, on procède à une détermination à blanc en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée.

Le calcul de la demande chimique exprimée en milligramme d'oxygène par litre s'effectue de la façon suivante :

$$\frac{(A - B)\ C \times 8\ 000}{D} - 0{,}226\ E$$

A : millilitres de sel de Mohr nécessaires pour le titrage de l'essai à blanc.
B : millilitres de sel de Mohr nécessaires pour le titrage de l'échantillon.
C : normalité de la solution de sel de Mohr.
D : ml de l'échantillon choisi pour l'essai.
E : charge en chlorure de l'échantillon en mg/l

Les valeurs d'oxydabilité diffèrent selon les méthodes employées et il ne semble pas qu'il y ait, entre elles, un rapport constant. La nature et la composition du substrat à doser influencent notablement les résultats obtenus. L'oxydation par le bichromate de potassium, à chaud pendant deux heures et en présence de catalyseur, fournit les valeurs les plus élevées pouvant même atteindre le double de celles obtenues à l'aide du sulfate cérique.

- Teneur en azote total

L'azote total est dosé par la méthode classique de KJELDHAL.

La minéralisation, au moyen d'acide sulfurique en présence de catalyseur au sélénium, s'effectue à partir de 500 ml d'eaux concentrées au maximum par évaporation à l'ébullition, d'abord dans un bécher puis dans un matras. L'eau de certains puits, contenant très peu d'azote, nécessite la concentration de 1 litre de liquide.

L'ammoniaque déplacée par une solution de lessive de soude est distillée dans l'appareil de Parnas-Wagner puis dosée par volumétrie.

- Dosage du sodium

Les atomes d'un élément excité par une flamme émettent des radiations de longueur d'onde déterminée dont l'intensité peut être mesurée par photométrie. La concentration initiale du cation à doser est déduite de la valeur absolue de l'intensité de l'émission spectrale mesurée. Pour nos dosages, nous utilisons un photomètre muni d'un dispositif à flamme brûlant un mélange d'oxygène et de butane, avec étalonnage à l'aide d'une gamme étalon de chlorure de sodium. Les résultats sont exprimés en gramme d'ion sodium par litre d'eau.

c) Analyse microbiologique

Elle doit être entreprise aussi rapidement que possible. Les eaux prélevées le matin sont examinées au début de l'après-midi. L'étude microbiologique comporte :

- l'évolution de la totalité des germes contenus dans l'eau constituant la microflore totale.
- le dénombrement des bactéries sulfato-réductrices.
- l'isolement et l'identification des micro-organismes.

- Numération de la microflore totale

La microflore totale représente l'ensemble des micro-organismes contenus dans 1 ml d'eau et capable de se développer, en présence d'air,sur un milieu déterminé.

On réalise des dilutions de 10 en 10 dans l'eau stérile de l'échantillon à analyser, le nombre de dilutions à effectuer dépendant de la richesse présumée en micro-organismes de l'eau. A partir de chaque dilution, on ensemence cinq tubes d'extrait de terre liquide. L'interprétation des résultats s'obtient classiquement par procédé statistique, en admettant que la présence d'un seul germe viable détermine une culture (tables de Mac Grady citées par POCHON (172)). Les lectures sont faites après incubation d'une semaine à la température de 28°C. Cette méthode ne permet pas une estimation quantitative absolue mais seulement comparative.

Le dénombrement de la totalité des germes anaérobies s'obtient par l'emploi de la même méthode mais les cultures se développent en absence d'air. L'incubation s'effectue dans une étuve sous-vide thermostatée à 28°C.

- Numération des germes sulfato-réducteurs

On ensemence par émulsion-dilutions un milieu contenant des sulfates, de l'azote minéral, un donateur d'hydrogène et du fer comme indicateur

de formation d'hydrogène sulfuré, terme de la réduction des sulfates.

Le milieu de culture utilisé est le milieu de STARKEY d'après POCHON (172) de composition suivante :

Chlorure d'ammonium	1 g
Phosphate bipotassique	0,5 g
Sulfate de magnésium	2 g
Sulfate de sodium	0,5 g
Chlorure de calcium	0,1 g
Solution de lactate de sodium à 60 %	6 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Le milieu réparti en tubes est stérilisé. Avant l'emploi, on ajoute dans chaque tube un fragment de fer stérilisé à la flamme et l'on ensemence comme précédemment cinq tubes de milieu de STARKEY avec une série de suspension-dilutions. Après incubation à l'étuve sous-vide à la température de 28°C pendant 14 jours, on procède au dénombrement des tubes positifs présentant un précipité noir de sulfure de fer dû à la réduction des sulfates. L'interprétation des résultats rejoint celle de la microflore totale. Cette méthode a surtout une valeur comparative.

Remarque : Lorsque l'on utilise un milieu de Starkey non fraîchement préparé, il est nécessaire de désaérer les tubes au bain-marie bouillant pendant vingt minutes.

- Isolement et identification des micro-organismes

Le milieu d'isolement employé a la composition suivante :

Eau résiduaire	250 ml
Extrait de terre	600 ml
Solution saline standard de Winogradsky	50 ml
Peptone pancréatique	1,5 g
Gélose	12 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Composition de la solution saline de Winogradsky :

Phosphate bipotassique	5 g
Sulfate de Magnésium	2,5 g
Chlorure de Sodium	2,5 g
Sulfate ferrique	0,05 g
Sulfate de Manganèse	0,05 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

L'eau résiduaire, fournie par le puits 7, est voisine de la neutralité. L'extrait de terre et la solution saline standard de Winogradsky apportent les sels minéraux et les oligo-éléments nécessaires à la croissance des micro-organismes. Quant à la peptone pancréatique, elle représente une source d'azote facilement assimilable et permet d'accélérer le développement.

L'emploi de phosphate bibasique d'ammonium a donné des résultats identiques. Ce milieu, après ajustement du pH à 7, est gélosé puis réparti en culots en tubes de 22 à raison de 25 ml par tube et stérilisé pendant 30 mn à 120°C.

Au moment de l'emploi, le milieu, préalablement liquéfié au bain-marie bouillant, est coulé en boîtes de Pétri stériles puis séché à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. A partir de l'échantillon prélevé, on réalise une série de dilutions généralement de 10^{-1} à 10^{-5} et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose deux gouttes de chaque suspension-dilution que l'on étale sur toute la surface du milieu. Une fois retournées, les boîtes sont placées à l'étuve à 28°C pendant 14 jours.

De nombreuses colonies apparaissent d'autant plus que la dilution est plus faible. En vue de l'isolement, on conserve uniquement les boîtes présentant un ensemble de colonies non confluentes et nettement séparées.On prélève, en premier lieu, les micro-organismes développés à la dilution la plus forte, à condition de retrouver à toutes les dilutions inférieures des colonies identiques. Ces micro-organismes constituent la microflore dominante.Dans un second temps, on isole les colonies apparues aux faibles dilutions de façon à recueillir un échantillon aussi complet et représentatif que possible des germes présents dans l'eau.

Les colonies prélevées sont désignées par un symbole indiquant le lieu et la date de l'isolement, nous aurons l'occasion de fournir de plus amples détails lors de l'exposé des résultats de l'identification des souches.

Des passages successifs sur milieu gélosé, dans les mêmes conditions, permettent de s'assurer de la pureté des souches isolées. Celles-ci sont repiquées mensuellement sur milieu gélosé incliné, de composition identique à celui utilisé pour l'isolement.

L'application des tests très classiques d'identification permet de dénommer les souches isolées conformément à la classification de PREVOT (105).

2 - Action des micro-organismes sur la dégradation des liqueurs noires.

Avant d'entreprendre la description des techniques utilisées,nous relaterons brièvement les méthodes de culture des micro-organismes.

a) Culture des micro-organismes

Les milieux de culture, dont la description sera faite lors de l'exposé des résultats, sont utilisés à l'état liquide répartis à raison de 50 ml dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml puis stérilisés à l'autoclave 30 minutes à 115°C.

Les souches, dont on veut étudier le rôle épurateur, sont mises en pré-culture sur milieu liquide, de composition identique au milieu

d'isolement, pendant 48 heures à l'étuve à 28°C. On ensemence ensuite à raison de 0,5 ml de suspension bactérienne autant de fioles d'Erlenmeyer contenant 50 ml de milieu que de souches à analyser. Une fiole stérile constitue le témoin. L'ensemble des cultures est pesé après ensemencement puis placé, sauf indication contraire, à l'étuve à 28°C pendant 7 jours. On peut ainsi réaliser la culture d'une souche unique ou d'une association de souches.

b) Techniques mises en oeuvre pour l'étude de la biodégradation des liqueurs noires.

Après incubation, la perte de poids de chaque culture, due à l'évaporation lors du séjour à l'étuve, est compensée par adjonction d'eau distillée stérile puis l'on procède à la détermination du pH. Les cultures subissent ensuite une centrifugation à 5 000 g pendant 20 minutes.

Le culot de centrifugation est mis en contact avec 50 ml de soude normale pendant deux heures en homogénéisant régulièrement le mélange pendant ce temps. Cette opération a pour but de solubiliser éventuellement les composés ligneux floculés ou adsorbés sur les corps bactériens pendant le développement des micro-organismes. On centrifuge à 5 000 g pendant 10 minutes et l'on mesure la coloration à 5 500 Å ou à 8 500 Å suivant la couleur obtenue, le témoin de mesure du spectrophotomètre étant la soude normale.

Sur le surnageant, on pratique trois analyses :

- Après ajustement à pH 7, le cas échéant, d'une fraction du surnageant, on procède à la mesure de l'indice de coloration suivant la méthode déjà décrite.

- A partir de 2 à 5 ml de milieu (la prise d'essai varie suivant la richesse en matières organiques), on détermine la demande chimique en oxygène totale (D.C.O. totale) par la méthode au sulfate de cérium. Les résultats sont exprimés en mg d'O_2 par litre.

- On précipite les composés ligneux (alcali-lignine) contenus dans 20 ml de milieu par 1/10e en volume d'acide sulfurique pur et concentré. La floculation intervient après quelques minutes de repos. Après centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes, on élimine le surnageant acide et l'on recueille le floculat qui est remis en suspension dans de l'eau distillée puis de nouveau centrifugé. Le culot de centrifugation subit encore, dans les mêmes conditions, deux nouveaux lavages. Après le dernier lavage, on entraîne le précipité dans le ballon d'oxydation et l'on procède au dosage d'oxydabilité. On connaît ainsi la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder les composés ligneux contenus dans 20 ml d'eau résiduaire. Par simple calcul, on exprime les résultats en mg/litre (D.C.O. alcali-lignine).

Il existe une autre méthode pour évaluer la teneur en lignine, c'est le dosage spectrophotométrique en ultraviolet.

A 2 100 Å, la densité optique d'une solution contenant de l'alcali-lignine est proportionnelle à la teneur en alcali-lignine. Les composés

ligneux sont extraits des eaux résiduaires suivant le mode opératoire précédemment décrit. Le précipité de lignine est redissous dans quelques millilitres d'ammoniaque en présence d'eau distillée. Par ébullition durant 15 minutes, l'ammoniac se volatilise. Sa disparition totale est contrôlée au papier pH. L'échantillon obtenu est dilué à l'aide d'eau distillée de manière à contenir 2 à 6 mg de lignine au litre.

La densité optique des dilutions est mesurée en cuve de quartz de 1 cm d'épaisseur, à 2 100 Å de longueur d'onde par rapport à l'eau distillée, au spectrophotomètre Jobin et Yvon. On effectue obligatoirement la correction de cuve. Si la densité optique mesurée dépasse 0,8 à 0,9, on réalise une dilution convenable pour obtenir une valeur comprise entre 0,2 et 0,6.

La teneur en lignine se calcule par la formule suivante :

lignine en mg par litre = D.O. corrigée x 10,6 x d

D.O. = densité optique d = coefficient de dilution

Toutes ces mesures du pH, de coloration, de D.C.O. totale et de D.C.O. alcali-lignine obtenues avec les milieux ensemencés sont comparées à celles du témoin traité dans les mêmes conditions. Les tableaux expriment alors les pourcentages de décoloration et de perte en D.C.O.

Remarque : La technique d'extraction et de redissolution de la lignine a permis, d'une part, de tracer les spectres d'adsorption en employant des solutions à 5 mg/l, et d'autre part, de reconstituer des eaux résiduaires "artificielles" renfermant des quantités exactement connues d'alcali-lignines.

Chapître I

EVOLUTION DES LIQUEURS NOIRES AU COURS DE LEUR INFILTRATION

Les eaux résiduaires déversées sur le terrain vont subir,en s'infiltrant, de profondes modifications physico-chimiques, le sol, comme tout milieu biologique en équilibre, réagissant énergiquement sous l'influence des agents extérieurs qui tentent de transformer ses caractéristiques d'origine.

Les principales variations analysées porteront sur le pH, la coloration et l'oxydabilité des eaux et également sur leur teneur en azote et en sodium. Il est, naturellement, indispensable de connaître en premier lieu, la nature de l'effluent épandu.

A - CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EFFLUENT.

Les eaux résiduaires renferment, en solution, des substances organiques principalement sous forme d'alcali-lignines accompagnées d'hémi-celluloses et des matières minérales telles que carbonate, sulfate et chlorure de sodium et à une concentration beaucoup plus faible des sels de calcium.

Les moyennes mensuelles résultant d'analyses hebdomadaires sont exprimées dans les tableaux n° 2, 3 et 4. Parmi les caractéristiques physiques, seules figurent les résultats des mesures de coloration. Nous n'avons pas jugé utile de mentionner les valeurs de pH, les liqueurs noires présentant des écarts de pH ne dépassant que très rarement une unité (pH compris entre 9 et 10).

Les processus biologiques d'épuration aboutissent à la minéralisation des matières organiques contenues dans l'eau, aussi est-il indispensable pour apprécier le degré d'épuration de connaître la teneur en substances réductrices présentes dans l'effluent. Les liqueurs noires fortement alcalines renferment en quantité appréciable des sels de sodium dont nous avons également suivi l'évolution dans le sol.

Si l'on se réfère aux tableaux des résultats d'analyse (tableaux 2, 3 et 4), on remarque que l'on peut distinguer quatre grandes périodes au cours de la durée de nos observations.

- la première, d'une durée de deux ans à compter du mois d'août 1959, se caractérise par le rejet de liqueurs noires à teneur élevée en substances réductrices. Si l'on excepte les mois de décembre 1960 et janvier 1961, l'oxydabilité varie de 1059 à 2490 mg d'O_2/l et la concentration en sodium oscille entre 0,261 et 0,642 g/l. La coloration des eaux, dont les indices sont compris entre 9 et 18, traduit l'ensemble de ces fluctuations.

- la seconde s'étend du mois de septembre 1961 au mois de mai 1965. Les effluents éliminés par épandage, nettement moins concentrés, présentent une composition chimique quantitativement plus stable. A quelques exceptions près, les résultats des analyses demeurent homogènes : les eaux moins colorées (indice moyen 6) renferment environ 700 mg de substances oxydables et 0,200 g de sodium par litre.

- du mois de juin 1965 au mois de septembre 1966, les eaux apportées à la station sont très colorées (indices de 12 à 35) et fortement chargées en matières organiques. L'oxydabilité augmente et atteint 2 700 mg d'O_2/l en juin 1965, chiffre largement dépassé en octobre de la même année avec des eaux parvenant à 6 665 mg d'O_2/l. La teneur en sodium s'élève également et se situe à 1,087 g/l en octobre 1965.

- à partir de 1967, toutes les valeurs décroissent. Les liqueurs noires possèdent encore une oxydabilité assez élevée allant de 1 328 à 1 712 mg d'O_2/l et une concentration en sodium de 0,266 à 0,350 g/l. Les indices de coloration varient de 8 à 13.

En 1968, les eaux beaucoup moins colorées (indice 4,5) ont, en moyenne, une demande chimique en oxygène de 520 mg d'O_2/l et une concentration en sodium de 0,150 g/l. En 1969, elles subissent une dilution encore plus élevée.

La composition chimique quantitative des eaux résiduaires présente donc de grandes variations dues aux modifications du circuit interne des eaux de recyclage et à la plus ou moins grande concentration des eaux de lavage de la pâte. L'intensité des processus d'épuration dépendra du volume d'effluent rejeté et de sa composition chimique.

Un facteur, d'origine climatique, influence de façon non négligeable le régime de déversement de l'effluent : il s'agit des précipitations atmosphériques qui, entre autre conséquence, diluent les eaux résiduaires déjà en place. Les renseignements météorologiques nous ont été communiqués par la station du Nézer proche du terrain d'épandage. Le tableau n° 5 regroupe les données mensuelles de 1959 à 1970.

La hauteur d'eau moyenne annuelle, pour cette région de climat atlantique, est de l'ordre de 1 000 mm (moyenne sur 10 ans). Les précipitations atmosphériques sont surtout très abondantes de septembre à décembre (moyenne de 500 mm pour ces quatre mois). Nettement plus faible en janvier (92 mm) elles décroissent régulièrement jusqu'en juillet (33 mm) pour augmenter de nouveau à partir du mois d'août (66 mm). Au cours de la durée de

nos observations, on note trois années particulièrement humides : 1960, 1965, 1966 et deux années très sèches : 1962 et surtout 1964.

Connaissant la hauteur d'eau mensuelle et la superficie du dispositif d'épandage, on peut calculer le volume d'eaux atmosphériques venant s'ajouter à celui des eaux résiduaires et connaître la dilution de l'effluent. Ainsi, par exemple,au mois de septembre 1965, la hauteur d'eau atteint 268 mm c'est-à-dire 268 litres par m2. L'épandage couvre une superficie de 50 000 m2. Le volume d'eaux atmosphériques représente donc 268 x 50 000 = 13 400 000 litres ou 13 400 m3 soit plus de la moitié de la contenance d'un bassin.Pendant la même période 8 352 m3 de liqueurs noires sont répandues : la dilution est donc considérable.Annuellement, à partir de 1964, elle est en moyenne de 12 % (24 % exceptionnellement en 1965). Il faut cependant envisager l'évaporation de la surface d'eau des bassins exerçant l'effet contraire. On peut l'évaluer, approximativement, à 350 mm par an et admettre qu'en moyenne, 3 à 4 % d'eau, seulement, sont éliminés annuellement par évaporation. La figure 7 représente les volumes d'eaux atmosphériques venues s'ajouter aux volumes d'eaux résiduaires. Il convient de noter que nous n'avons tenu compte que des précipitations atmosphériques intéressant le dispositif d'épandage (canaux superficie 1,5 ha, bassins 5 ha). Il est bien évident que les chutes de pluie tombant sur le terrain avoisinant doivent avoir une influence beaucoup plus difficile à évaluer. Sans aucun doute, les fortes pluies d'hiver pénètrent profondément dans le sol et atteignent la nappe phréatique. Quant aux pluies d'été, leur action semble plus limitée par l'évapo-transpiration (650 mm par an). Ces réserves faites, on remarque que les pluies ont une grande influence des mois d'octobre à mars diluant fortement les liqueurs noires. Dans les cas extrêmes, elles provoquent le lessivage naturel du sol. En dehors de cette période, leurs effets s'atténuent, exceptions faites pour l'année 1963 et le 1er semestre de 1964 où les apports d'effluents sont restreints pour les raisons indiquées précédemment.

Les températures moyennes mensuelles, consignées dans le tableau n° 6, complètent les données climatiques susceptibles d'agir sur les phénomènes biologiques.

Nous sommes maintenant en mesure de suivre l'évolution des eaux pendant leur trajet dans le sol.

B - MODIFICATIONS PHYSIQUES

Les liqueurs noires, à réaction très alcaline et fortement colorées, ne constituent pas un milieu favorable à la mise en oeuvre de processus microbiologiques efficaces.

Après infiltration dans le sol, les caractéristiques physiques des eaux seront sujettes à des variations. Le sens de ces variations permettra, ou non, l'instauration d'une épuration biologique.

1 - pH

Les résultats sont résumés dans le tableau n° 7 et représentés en courbes sur les figures 8, 9 et 10.

Dès l'origine, au mois de décembre 1959, le pH est fortement abaissé à 6,35 dans l'ensemble des puits les plus proches du dispositif d'épandage (puits 7 et 11). Les valeurs augmentent ensuite sensiblement et atteignent la neutralité au mois d'avril 1960. A partir de cette date, une tendance à la stabilisation se manifeste, coïncidant avec une forte diminution de l'infiltration des eaux résiduaires malgré de faibles précipitations atmosphériques. Pendant l'arrêt de l'épandage, de juillet à novembre 1960, les pH accusent une hausse brutale au puits 7. De 7,20 en juillet, ils s'élèvent à 8,10 en septembre et à 8,70 au mois de décembre bien que la pluviosité soit très abondante (786 mm). La remontée est plus lente et plus tardive au puits 11 (pH de 8,0 en décembre). A partir du mois de décembre 1960, le sol, lessivé par les pluies diluviennes, retrouve sa perméabilité initiale et permet la reprise correcte de l'épandage.

Il s'ensuit, pendant le 1er semestre de 1961 caractérisé par une faible pluviosité et un apport moyen d'effluents (environ 150 000 m3), une baisse de pH aboutissant au puits 7 à une stabilisation entre 7,60 et 7,80 et au puits 11 à une remontée régulière avec un maximum de 8,55 en juillet.

Au cours des premiers mois de l'année suivante, les valeurs des eaux au puits 11 oscillent entre 7,20 et 7,50, tandis qu'elles augmentent au puits 7 (8,10 en février et mars) puis diminuent et se stabilisent aux alentours de 7,30 pendant les mois d'été.

En 1963, le même phénomène,consistant en une alcalinisation légère au printemps suivie en été et en automne d'un retour à la neutralité, se produit au puits 7. Le puits 11 présente la même évolution : les valeurs baissent régulièrement de 8,00 en mars à 6,65 en septembre.

A partir de 1964,année de la transformation des canaux en bassins, le pH faiblit nettement à 6,50 dans les deux puits considérés, cependant la sècheresse relative favorise l'élimination d'un volume accru d'effluent.

En 1965, et pendant les dernières années d'observation,les résultats sont du même ordre : les pH subissent peu de variations et restent toujours légèrement inférieurs à la neutralité.

L'abaissement rapide et constant du pH des eaux résiduaires après infiltration sur une faible distance ne peut être dû, principalement,qu'à l'action acidifiante du sol de la station d'épandage. On retrouve classiquement dans le sol, selon GAUCHER (92), deux formes d'acidité : l'acidité réelle provenant de la quantité d'ions H^+ existant dans le milieu sous l'action de la dissociation ionique des molécules à valence acide, symbolisée par le pH et l'acidité totale (ou de titration) matérialisant la quantité totale d'hydrogènes remplaçables par un métal. Les matières humiques, colloïdes électronégatifs hydrophiles, constituent le complexe absorbant qui est à l'origine de cette réaction en donnant naissance à des ions H^+et en régissant les conditions de l'équilibre acide-base. La quantité d'ions H^+ d'une part,fixés sur le complexe et d'autre part, celle qui existe dans les solutions du sol

(fournie en partie par le complexe et variable selon les pluies), détermine les deux composantes du pH.

L'humus est également responsable du pouvoir tampon du sol. Ce dernier, très faible et pratiquement nul pour les sables, d'autant plus que ceux-ci sont plus purs, augmente avec la proportion de matière organique et d'humus élevant la capacité totale d'échange (capacité de saturation).Du fait de sa réaction acide, l'humus a un pouvoir tampon supérieur vis-à-vis des bases et peut donner lieu à des processus d'échange avec les cations dissous dans les eaux du sol. La capacité de saturation grandit avec la teneur en carbone et le degré d'humification.

Le sol du terrain d'épandage, d'un pH compris entre 4 et 4,5, révèle un complexe absorbant voisin de la désaturation avec dominance d'ions H^+ fixés énergiquement par l'humus. On peut émettre l'hypothèse suivante.En présence de liqueurs noires alcalines renfermant des cations Na^+, il y a formation d'humates sodiques abaissant le pH suivant la réaction :

$$\text{Humus } H^+ + \text{Na O H} \longrightarrow \text{Humus } Na^+ + H_2O$$

Cette réaction réversible se poursuit jusqu'à saturation du complexe. La capacité de saturation de l'humus, selon les pédologues, avoisine 350 à 400 milliéquivalents pour 100 g, la fixation maximum de base s'effectuant à un pH assez élevé (pH 9). L'humus retrouve sa capacité d'échange lors des chutes de pluie favorisant l'élimination des bases et le lessivage ; le degré de saturation est d'autant plus bas que la pluviométrie est plus grande. Ainsi peut-on expliquer, qu'en 1960, pendant la suspension de l'épandage et sous l'action de fortes pluies, les eaux prélevées aient eu un pH en augmentation. Il est bien évident que cette alcalinisation est passagère et cesse lorsque les pluies persistent. On peut interpréter de la même façon les augmentations de pH pendant l'hiver et le printemps 1962 et 1963, périodes pluvieuses et de faibles déversements de liqueurs noires, et l'acidification des eaux en été par le processus inverse.

L'arrêt obligatoire de l'épandage pendant la saison humide, s'il représente une contrainte pour les industriels, se révèle finalement bénéfique puisqu'il permet au sol de régénérer son complexe absorbant.

Les prélèvements effectués selon la ligne des puits 7 (figure 8) permettent de suivre l'évolution du pH des eaux en fonction de la distance du lieu de l'infiltration.

L'abaissement de pH observé au puits 7 continue au puits 18 situé à 20 mètres au Nord avec des variations analogues (figure 8). Du mois de décembre 1959 au mois d'avril 1961, le pH augmente de façon régulière de 6,30 à 7,80, se stabilise ensuite aux environs de 7,60 jusqu'en mai 1962 avec de très faibles oscillations puis décroît sensiblement jusqu'en décembre 1964 pour atteindre 6,55, exception faite pour les mesures relevées au cours du mois de juin 1963 (8,40) et des fluctuations de faible amplitude (6,50 à 7,15). Au

cours de l'année 1965, les valeurs se stabilisent à une moyenne de 6,70 - 6,80 avec une remontée passagère en septembre. Par la suite, les eaux sont voisines de la neutralité et les résultats comparables à ceux du puits 7. Il faut également signaler que l'acidification des eaux croît avec la profondeur. Ainsi en 1961, le puits 18 ter (6 m) renferme des eaux de pH 8,05, le 18 bis (8 m) : 7,65 et le 18 (10 m) : 7,50.

Les résultats enregistrés au puits 7B (tableau n° 7) concordant avec ceux du puits 18, l'acidification apparaissant plus tardivement en 1967 et 1968 (6,50 à 6,60).

Le puits 7D (figure 8) foré à 160 m au Nord du précédent recueille des eaux plus acides n'évoluant que de 6,30 à 6,80. Au 7E (figure 8), les valeurs nettement inférieures d'avril 1962 à septembre 1963 augmentent ensuite régulièrement : 6 en mars 1964, 6,35 en avril 1965, 6,70 de 1967 à 1970.

Enfin, le puits FF (tableau n° 7), le plus éloigné du dispositif d'épandage, ne paraît jamais avoir été atteint par la nappe d'eaux résiduaires : le pH compris entre 5,50 et 6,00 correspond à celui de l'eau naturelle.

Suivant cette ligne, l'acidification s'effectue progressivement : faible aux puits 18 et 7B, elle s'intensifie aux 7D et 7E. A partir de 1965, les variations individuelles s'amortissent et l'on tend vers une homogénéisation confirmée par les derniers relevés de 1970 (figure 8 et tableau n° 7).

L'étude de l'évolution suivant la ligne des puits 3 (figure 9) met en relief, d'une part, au puits 3B des eaux neutres avec une alcalinisation de courte durée à 7,30 et 7,70 respectivement en juin 1962 et février 1964 et, d'autre part, au puits 3C une légère acidification sujette à des variations non significatives. L'allure de la courbe de mesures au 3D (figure 9) diffère des précédentes. En mai 1962, les prélèvements accusent un pH de 5,50, pH qui augmente ensuite jusqu'en 1964 pour atteindre 6,50. De 1965 à 1970, aucun changement n'intervient.

Le puits TD (figure 9), à l'extrémité de la ligne, ne subit pas l'influence des eaux résiduaires jusqu'au mois d'avril 1965, soit pendant près de six ans. A partir de cette date, le pH augmente. Les mesures effectuées de 1965 à 1970 correspondent aux observations précédentes.

Les variations relevées au puits 5C et 5D mis en courbes sur la figure 10 sont en tous points comparables à celles des puits 3C et 3D situés 100 m à l'Ouest.

A l'Est et à l'Ouest du terrain d'épandage (tableau n° 7), aucun phénomène nouveau n'apparaît : à la période d'élévation de pH fait suite une phase de stabilisation aux valeurs légèrement en-dessous de la neutralité. La remontée de pH intervient d'autant plus tardivement que le puits est plus

éloigné du lieu de l'épandage (puits 1 à 4E en 1965). Aux puits F6, F7 et F8, les variations des eaux, tantôt neutres, tantôt acides, peuvent s'expliquer par des déplacements de la nappe d'eaux résiduaires. Les puits creusés sur la rive opposée du ruisseau limitant à l'Ouest le terrain d'épandage, de même que ceux localisés au Sud du dispositif d'infiltration, ne sont alimentés qu'en eau naturelle.

En conclusion, la neutralisation des liqueurs noires s'opère rapidement après infiltration sur une faible distance puis jusqu'à environ 200m de l'épandage vers le Nord, les eaux forment un ensemble homogène subissant les mêmes variations. Au-delà de cette distance, les liquides s'acidifient pour présenter finalement les caractéristiques de l'eau naturelle.

On peut, en résumé, attribuer trois causes essentielles à l'abaissement de pH des liqueurs noires.

1° A proximité de l'épandage, c'est-à-dire jusqu'à 40 m de distance vers le Nord, les eaux résiduaires, très alcalines, lessivent les composés humiques du sol avec formation d'humates sodiques. De ces échanges acide-base, résulte une neutralisation rapide des eaux.

2° Au cours des années, avec l'épandage d'un volume élevé de liqueurs noires, les réserves humiques du sol diminuent et l'on remarque, de 1959 à 1963, une élévation progressive des pH dans l'ensemble des prélèvements mais surtout aux puits 7, 11 et 18 situés en bordure du lieu de l'infiltration. Les eaux tendent nettement vers une alcalinisation. Paradoxalement, à partir de l'année 1964 (2e semestre), elles s'acidifient ; la majorité des valeurs se situent en dessous de la neutralité (6,50 à 6,90). C'est à ce moment qu'intervient la seconde cause d'abaissement de pH des liqueurs noires par la transformation des canaux en bassins, au mois de juillet 1964. L'acidification des eaux peut alors s'interpréter de la façon suivante. La hauteur d'eau dans les bassins atteint 1 m contre 2,5 m dans l'ancien dispositif. Les conditions d'aération, par échanges gazeux avec l'atmosphère, sont donc très améliorées. D'autre part, l'influence des précipitations atmosphériques y est supérieure puisque la dilution est inversement proportionnelle à la hauteur de l'effluent.

L'augmentation des échanges gazeux, l'influence des eaux atmosphériques liées au temps de rétention plus grand et au faible pouvoir tampon des liqueurs noires concourent à l'abaissement de pH. De nombreuses mesures effectuées à partir de prélèvements d'eau des bassins le prouvent : les valeurs sont déjà inférieures à pH 8.

3° Une dernière cause de la neutralisation des eaux peut consister dans la solubilisation de la silice sous forme de silice hydratée. Bien que considérée comme pratiquement insoluble, la plupart des eaux de nappes et de rivières contiennent de la silice jusqu'à 20 ou 40 mg/l comme le fait remarquer DEMOLON cité par GAUCHER (92). Selon le même auteur, dès que le pH atteint 9, on observe une ionisation de $Si(OH)_4$. Ce phénomène ne peut se produire qu'à proximité de l'épandage lorsque les eaux résiduaires sont encore à réaction alcaline.

Les variations de pH permettent également de suivre le cheminement des eaux résiduaires au sein du sol. Celui-ci s'effectue principalement en direction de l'Eyre (Sud-Ouest-Nord-Est) et vers le puits F3 situé au Nord.

Les caractéristiques du terrain et le dispositif d'épandage employé permettent une neutralisation rapide des eaux résiduaires très alcalines et instituent un facteur favorable au développement des micro-organismes donc à l'épuration.

2 - Coloration

Le tableau n° 2 et la figure 11 traduisent les variations de coloration des liqueurs noires déversées.

En 1959 et 1960, la coloration, exprimée en moyenne annuelle, atteint 12,5. De 1961 à 1964 avec des rejets d'eaux plus diluées, les indices colorimétriques varient seulement entre 5 et 7,5. Les années suivantes se caractérisent par l'épandage d'eaux résiduaires fortement concentrées parvenant à la coloration de 35 et se situant en moyenne annuelle à 15,5. En 1967, les liqueurs noires nettement moins colorées accusent des teintes de 10. De 1968 à 1970, les indices varient entre 3 et 6.

Dans l'exposé suivant, lorsque les eaux infiltrées auront des valeurs supérieures à celles de l'effluent, le terme de surcoloration sera employé et dans le cas contraire, celui de décoloration. Les résultats généraux sont consignés dans le tableau n° 8.

Les courbes des mesures suivant la ligne des puits 7 (figures 11 et 12) montrent qu'en 1959, quatre mois environ après la mise en service de l'épandage, les liquides recueillis au puits 7 n'ont subi aucune modification de couleur.

Au cours de l'année 1960, de janvier à mai, les eaux perdent légèrement de leur couleur : les mesures avoisinent 10. Pendant l'été, parallèlement à un ralentissement de l'infiltration, les eaux sont légèrement surcolorées : les valeurs atteignent l'indice 16, par la suite, elles diminuent et redeviennent comparables à celles observées en début d'année. Cette surcoloration passagère, pendant l'arrêt de l'épandage et en période inhabituelle de fortes pluies, s'explique par le lessivage du terrain. VAN BENEDEN (P. et G.) (231) observent le même phénomène sur des sols riches en matières humiques et soumis à une forte pluviosité.

En 1961, les prélèvements, d'abord semblables aux eaux résiduaires épandues, subissent une légère surcoloration jusqu'en 1964 : de 7 en 1963, la teinte passe à 10 en 1964. L'année suivante, malgré l'épandage de liqueurs noires très concentrées, les eaux infiltrées se décolorent surtout de septembre à novembre (indice 6). Enfin, au cours des dernières années d'observation, une forte surcoloration se manifeste puis décroît en 1970.

En résumé, après une infiltration sur une faible distance, les eaux résiduaires subissent peu de variations de 1959 à 1965. L'augmentation constatée en 1967 et 1968 est sans doute la conséquence du rejet antérieur d'effluents très colorés en 1965 et 1966. Ces remarques s'appliquent également au puits 11 localisé à 100 m de l'extrémité Ouest du dispositif d'infiltration.

La série des puits 18, 18 bis, 18 ter de profondeurs différentes permet de faire les remarques suivantes. Il a été signalé que l'acidité des eaux augmentait avec la profondeur. En examinant le tableau suivant, on constate, surtout pour les deux premières années, que la coloration croît proportionnellement à la profondeur.

Puits / Années	18 (10 m)	18 bis (8 m)	18 ter (6 m)
1959	22,5	18	14
1960	14,75	11,50	11
1961	11,50	8,75	8,75
1963	7	8,75	8

Variations de la coloration en fonction de la profondeur dans les eaux des puits 18.

Par la suite, ces différences s'estompent : les trois niveaux de prélèvements considérés s'homogénisent. L'ensemble de ces puits demeure donc difficilement comparable au puits 7 foré à 3 m de profondeur seulement, tout au moins pour le début des observations. Malgré tout, les liquides analysés au puits 18 ter présentent des variations analogues à celles du puits 7 de 1959 à 1963. A dater de 1964, les résultats très voisins dans les trois puits 18 correspondent à ceux du puits 7.

Le puits 21 (figure 12),dont l'étude débute en 1961, renferme à cette époque des eaux nettement surcolorées avec un maximum de 16,5 en mai 1961. Tout en restant supérieures à celles de l'effluent, les valeurs diminuent en 1963 pour arriver à 7,5 en juin. Après une augmentation de septembre à novembre 1963 suivie d'une baisse, la teinte des eaux se stabilise en 1964, les indices n'évoluant qu'entre 7 et 9. De 1965 à 1967, la coloration s'élève de 12,5 à 25,5 pour décroître de nouveau en 1968.

Le puits 7B (tableau n° 8) révèle les mêmes modifications.

L'amplitude des variations s'accroît au puits 7D. Les premières mesures d'avril 1961 indiquent une eau très faiblement colorée d'indice 1,5. La coloration augmente fortement en avril 1963 (figure 12) avec un maximum de 30,5 puis faiblit régulièrement de 27,5 en juin à 24,5 en septembre et à 22 en novembre. La baisse se poursuit régulièrement en 1964 et 1965 où les eaux ont une coloration de 6,5. La surcoloration réapparait en 1967.

Quant au puits 7E (figure 12), les eaux se colorent en 1963 et 1964, la teinte se stabilise en 1965. La remontée maximum a lieu en mai 1967 (13,5). Confirmant les mesures de pH, le puits FF renferme de l'eau naturelle.

Les résultats des mesures effectuées selon la ligne des puits 7 autorisent à penser que les eaux de chaque puits ont évolué de façon identique à des périodes différentes. Après une augmentation régulière, la coloration passe par un maximum, très élevé au puits 7D, puis décroît lentement. L'augmentation de 1967 - 1968 peut s'expliquer par le rejet d'effluents très colorés.

L'étude des prélèvements selon la ligne des puits 3 confirmera ces remarques (figure 13). L'analyse des eaux du puits 3B débute en avril 1963. La coloration élevée atteint 16 puis diminue régulièrement en 1964 et 1965 où elle ne mesure plus que 4 d'indice. Comme précédemment, la surcoloration se produit en 1967 et 1968.

L'allure générale des variations au puits 3C est semblable et les valeurs très voisines de celles relevées au puits 7D.

Le puits 3D permet de suivre complètement l'évolution de la coloration. D'avril 1963 à mars 1964, elle varie de 19 à 27,5 puis diminue à 20 en octobre. En 1965, la baisse se poursuit, les eaux, d'indice 16 en novembre, atteignent 5,5 en 1967. Le maximum se situe donc en mars 1964 soit une année plus tard qu'au puits 3C.

Les eaux du puits TD, aux variations semblables à celles du 7E,se colorent lentement et constamment parvenant à la valeur de 18 en 1968.En 1970, la couleur n'est plus que de 10.

Les résultats obtenus, d'une part, au puits 5C et, d'autre part, aux puits 5D et 1D (figure 14), reflètent une analogie avec ceux du 3C et 3D situés 100 m à l'Ouest. Aucune surcoloration n'intervient en 1967 et 1968.

L'évolution des puits 1 à 4E, à l'extrémité Est du terrain (tableau n° 8), rappelle celles des puits 7D et 7E. Après une constante augmentation de la teinte de 1963 à 1965, les eaux se décolorent et tendent à se rapprocher des caractéristiques de l'eau naturelle de 1967 à 1970.

Les puits F6, F7 et 2D (tableau n° 8) sans doute à l'écart du

cheminement de la nappe d'eaux résiduaires, contiennent des eaux uniformément et faiblement colorées.

Les fortes colorations des eaux prélevées en 1962 et 1963, au puits F3, à proximité du ruisseau, perdent de leur intensité les années suivantes sauf en 1968 et 1970.

Le puits F4 subit peu de changement. La couleur varie de 1 à 5, tandis que le puits F5, plus rapproché de l'épandage, renferme des eaux dont la coloration baisse régulièrement à partir de 1963.

Les prélèvements effectués sur la rive opposée du ruisseau révèlent que la nappe d'eaux résiduaires n'a jamais franchi le lit du ruisseau, véritable "barrière naturelle".

Les variations de coloration sont soumises à l'influence de deux facteurs principaux : le lessivage de l'humus par les liqueurs noires alcalines et les différences de concentration de ces mêmes liqueurs au départ de l'usine.

1° Les matières humiques constituant le complexe absorbant du sol renferment des colloïdes électronégatifs hydrophiles. Ces colloïdes peuvent être, d'une part, dispersés par des ions de même charge (essentiellement des ions OH^-) et subir des migrations, d'autre part, floculés par des ions de charge contraire (ions H^+, cations). Le pH régit l'état physique des matières humiques. Pour des valeurs comprises entre 8,5 et 10, conditions réalisées à proximité immédiate de l'épandage, l'humus, dispersé, migre à l'état d'humates alcalins.

De 1959 à 1960, les eaux résiduaires épandues présentent une coloration très voisine, en moyenne de 12,5. Cependant, au puits 18 (40 m de l'épandage), les eaux, d'abord fortement surcolorées, perdent ensuite de leur couleur tandis que le pH augmente. On remarque également de grandes différences entre les valeurs des mesures des prélèvements effectués au puits 7 situé à 20 m de l'infiltration et au puits 18 à 40 m.

On peut donc admettre qu'aussitôt la mise en service de l'épandage, au mois d'août 1959, les eaux ont été fortement surcolorées par dissolution des composés humiques, d'abord au puits 7 le plus proche de l'épandage. Après épuisement rapide des colloïdes humiques, la coloration diminue et progressivement se rapproche de celle de l'effluent : l'élévation de pH traduit ce phénomène. Cette nappe souterraine, constituée d'eaux résiduaires et d'humus en solution, continue sa progression au sein du sol et atteint d'autant plus rapidement les puits étudiés que ceux-ci sont plus proches du lieu de l'infiltration. Les eaux du puits 18, localisé à 40 m, présentent, lors des premières mesures des mois de novembre et décembre 1959, une coloration de 23, puis celle-ci diminue et parvient à 12,5 au mois d'avril 1960. Parallèlement, on assiste à une remontée de pH. A partir du puits 18, la nappe d'eaux surcolorées suit deux cheminements distincts :

Le premier, en direction du Nord, intéresse les puits de la ligne 7 jusqu'au 7D (340 m de l'épandage), atteint entre 1962 et 1963, et ensuite bifurque vers l'Ouest en direction du puits F3. Cette détermination de modification d'écoulement est rendue possible grâce à l'examen ces eaux faiblement teintées au puits 7E.

Le second cheminement s'effectue en direction Sud-Ouest/Nord-Est, c'est-à-dire vers la rivière, par suite de l'inclinaison naturelle des couches du sol et peut être matérialisé par les puits 3C, 5C, 5D et 1D en laissant à l'écart le puits 3B. Tous ces puits , en 1963, sont alimentés par des liquides très teintés.

A partir de 1964-1965, les colorations diminuent, le passage de la nappe est terminé : il aura duré au total environ cinq ans.

Dans tous les cas, on remarque qu'à l'avant de la nappe colorée, les liquides prélevés possèdent des caractéristiques très proches de celles de l'eau naturelle. Doit-on considérer ces eaux comme appartenant à la nappe phréatique ou proviennent-elles de liqueurs noires en majeure partie épurées biologiquement ?

Le calcul suivant permet de répondre à cette question. A la fin de l'année 1962, le volume total des eaux résiduaires déversées représente 1 500 000 m3 qui, immobilisées sur place, occuperaient une surface d'environ 30 hectares sur 5 m d'épaisseur, surface approximativement occupée par les eaux à cette époque. Le terrain ayant une porosité de 0,30, les 5 mètres d'eau occuperaient dans le sable une hauteur de 17 mètres or la couche de sable mesure au maximum 10 m. Il est donc impossible que ces eaux aient pu stagner surtout si l'on envisage le volume des eaux naturelles, en particulier les eaux de pluie, venant s'y ajouter (1 100 000 m3, soit une hauteur de 3,60 m). Même en tenant compte de l'inégale répartition dans le sol des pluies d'été et d'hiver, des pertes en eau par évapo-transpiration de la couverture végétale (importante dans les régions limitrophes du terrain d'épandage), et atteignant 650 mm par an, on doit admettre que ces eaux, après avoir été soumises à l'épuration biologique, sont entraînées comme les eaux naturelles et qu'on ne peut détecter leur présence.

2° Le second facteur influençant les variations de couleur des eaux est d'origine externe et réside dans les différences de concentration des liqueurs noires au départ de l'usine. L'exemple type est fourni en 1965 et 1966. Pendant cette période, les eaux épandues sont fortement colorées. La conséquence de tels rejets se fait sentir lors des prélèvements de 1967 par une augmentation intense de la couleur surtout dans les puits de la ligne 7 et au puits F3, c'est-à-dire suivant le premier cheminement décrit plus haut. Les valeurs baissent l'année suivante pour atteindre de nouveau l'état d'équilibre instauré en 1965.

A ces deux facteurs dont l'un relève du passé, s'ajoute l'action de la pluviosité, qui en lessivant le sol entraîne, au début, une augmentation

de la couleur. Avec la persistance des pluies, les liquides du sol sont dilués et la teinte des eaux infiltrées diminue.

Nous ne saurions, vues les conditions favorables de pH, sous-estimer le rôle des micro-organismes présents dans le sol. Par leurs propriétés biochimiques ou les produits de leur métabolisme, ils peuvent influer sur la coloration des eaux.

C - VARIATIONS BIOCHIMIQUES

L'abaissement de pH à la neutralité et les variations d'intensité de la coloration autorisent à supposer l'existence d'une épuration biologique. Le déroulement du phénomène en profondeur en complique son étude, seule l'analyse chimique des eaux prélevées dans l'ensemble des puits du terrain d'épandage permettra de mettre en évidence les phénomènes d'épuration et de les caractériser. Trois catégories de substances seront dosées : les matières organiques par un procédé indirect indiquant le pouvoir réducteur des eaux (oxydabilité), l'azote total, et enfin dans le but de prévoir des phénomènes de toxicité, la teneur en sodium.

1 - Oxydabilité

L'effluent contient une certaine quantité de matières organiques sous forme de composés du bois extraits lors de la fabrication de la pâte. Le tableau n° 3 de la composition chimique des eaux résiduaires en mentionne les concentrations, d'ailleurs très variables. Au niveau du terrain d'épandage, s'ajoutent les substances oxydables du sol résultant pour la plupart de synthèses ou de dégradations microbiennes sous forme principalement de matières humiques.

Les résultats des mesures d'oxydabilité des eaux des différents puits sont résumés dans le tableau n° 9.

De 1961 à 1962, l'oxydabilité des eaux du puits 7 (figure15) diminue de 745 à 322 mg d'O_2/l avec une remontée passagère en février et mars 1962 coïncidant avec une élévation de pH. Si, pendant cette période, le volume de l'effluent répandu s'accroît considérablement (plus de 500 000 m3), sa demande chimique en oxygène est moins élevée en 1962 qu'en 1961 (826 mg d'O_2/l au lieu de 960 mg en 1961).

En 1963, les valeurs demeurent du même ordre et oscillent entre 310 et 395 mg d'O_2/l. Cette stabilité peut s'expliquer par un faible rejet d'eaux résiduaires plus diluées, de 664 mg/l d'oxydabilité moyenne.

L'année suivante, après la reprise de l'épandage en bassins, les eaux du puits 7 se colorent : l'oxydabilité s'élève à 540 mg d'O_2/l puis

diminue en décembre où elle atteint 300 mg à un pH de 6,50 tandis que celle de l'effluent est très voisine de 750 mg d'O_2/l.

En 1965, parallèlement à une augmentation de pH et de coloration, les eaux s'enrichissent en substances oxydables (de 365 à 550 mg d'O_2/l).Puis les caractéristiques physiques s'inversant, les valeurs diminuent et atteignent 320 mg d'O_2/l. Le rejet d'eaux résiduaires à forte concentration n'a aucune répercussion notable.

L'oxydabilité augmente en 1967 et parvient à 627 mg d'O_2/l mais diminue en 1970 (231 mg d'O_2/l). Comparées aux liqueurs noires d'épandage,les eaux prélevées au puits 7 perdent de leur pouvoir réducteur.

Au puits 11 (tableau n° 9) l'évolution, semblable, ne diffère que par une demande en oxygène plus élevée en 1965 qu'en 1967.

Les eaux du puits 18 (figure 15) montrent un comportement identique à celles du puits 7 avec des résultats en tous points comparables, exception faite de l'année 1964 où les teneurs baissent de 330 à 160 mg d'O_2/l, baisse accompagnée d'une acidification et d'une décoloration des eaux.

Au puits 21 (figure 15), situé à 100 m de l'épandage toujours dans la direction du Nord, la teneur en substances oxydables en 1962 et 1963 dépasse celles relevées aux puits 7 et 18. Cependant, à partir de mars 1963, une baisse analogue à celle remarquée au puits 18, s'amorce ne prenant fin qu'en décembre 1964. A partir de cette date, l'oxydabilité augmente fortement surtout en 1967 avec une valeur de 1 140 mg d'O_2/l.

Au puits 7B (figure 15), la principale différence consiste en des concentrations beaucoup plus fortes de l'ordre de 1 100 mg d'O_2/l pendant l'année 1962. Comme au 21 mais de façon plus marquée, les teneurs diminuent progressivement jusqu'en décembre 1964 où les eaux ne demandent plus que 216 mg d'O_2/l pour être totalement oxydées. Après une remontée lente de 292 à 372 mg d'O_2/l en 1965, les valeurs maxima se situent en 1967 et sont voisines de celles notées au puits 21. En 1970, la demande chimique en oxygène est, en moyenne, de 420 mg d'O_2/l.

Au puits 7D (figure 15), de mars 1962 à février 1963, contrairement aux exemples précédents, l'oxydabilité augmente constamment et passe de 556 à 826 mg d'O_2/l. Les très faibles colorations enregistrées en avril 1961 incitent à conclure à une atteinte de ce puits par la nappe d'eaux résiduaires vraisemblablement dans le second semestre de 1961. A partir de 1963,l'allure de la courbe concorde avec celle des autres puits.

Le puits 7E (figure 15), situé à 80 m au Nord du 7D, subit l'action des liqueurs noires plus tardivement, sans doute au second semestre de 1962, comme le prouvent les premières analyses d'oxydabilité. Cette dernière, faible de 70 mg d'O_2/l, s'élève à 130 mg en juillet puis se stabilise en 1963. Reflétant la tendance générale, les valeurs les plus fortes s'observent en 1965 et 1967 avec une concentration de 525 mg d'O_2/l, résultat inférieur à celui du puits précédent.

Quant au puits FF, ses eaux acides et incolores sont très faiblement oxydables (10 mg d'O_2/l).

Le tableau suivant résume les variations de la demande chimique en oxygène, exprimées en moyennes annuelles, dans les prélèvements de la ligne des puits 7.

Puits \ Année	1961	1962	1963	1964	1965	1967	1970 (1er sem.)
Effluent	960	826	664	755	2 430	1 608	
7 (20 m)	745	524	352	399	411	627	231
11 (20 m)	685	441	336		759	459	312
18 (40 m)	693	491	411	281	388	756	240
21 (100 m)	588	551	527	337	481	1 140	
7B (180 m)	1 193	983	441	367	319	1 055	420
7D (340 m)		680	788	454	414	770	
7E (420 m)		100	110	244	332	525	332
FF (500 m)					12		10

Variations des moyennes annuelles de l'oxydabilité (en mg d'O_2/l) suivant la ligne des puits 7 et au puits 11.

On remarque que les puits 7, 11, 18 et 21 situés dans un rayon de 100 m du dispositif d'épandage ont une demande chimique en oxygène inférieure à celle de l'effluent. Cette constatation implique des réserves, l'infiltration des liqueurs noires n'étant pas immédiate, sa durée variant avec la distance au lieu de prélèvement.

La perte d'oxydabilité peut s'interpréter de la façon suivante. Les micro-organismes du sol puisent dans les eaux résiduaires les composés nutritifs facilement biodégradables, c'est-à-dire les substances responsables de la D.B.O. De ce fait, la demande chimique en oxygène diminue. Les valeurs les plus fortes mais passagères intéressent les puits 7B et 7D soit à une distance comprise entre 180 et 340 m de l'épandage. L'oxydabilité très élevée au puits 7B, en 1961 et 1962, peut s'expliquer par le passage de la nappe colorée provenant du lessivage de l'humus dans les régions plus proches de l'infiltration. Le même phénomène s'est vraisemblablement produit aux puits 7,11, 18 et 21 en 1959 et 1960. Il semble qu'en règle générale, l'oxydabilité varie dans le même sens que la coloration : la dispersion et la migration du complexe absorbant provoque, outre la surcoloration des eaux, une élévation de la demande chimique en oxygène par enrichissement en matières organiques.

D'année en année, la concentration en substances oxydables diminue, cette baisse peut s'interpréter comme la conséquence de la mise en oeuvre d'un processus d'épuration. De 1965 à 1967, suite à l'épandage d'un volume élevé de liqueurs noires très concentrées, l'oxydabilité s'élève surtout entre 100 et 180 m de l'épandage. Les dernières mesures de 1970 révèlent une épuration très efficace.

Le puits 7E (420 m de l'épandage), atteint plus tardivement par la nappe d'eaux résiduaires en partie épurée, accuse des teneurs en constante augmentation. En 1965, les valeurs se rapprochent de celles des puits déjà étudiés. Comme précédemment, l'évolution est identique de 1965 à 1970.

A l'Ouest de la ligne 7, le puits 9C (tableau n° 9) renferme, en 1962, des eaux à oxydabilité élevée (environ 1 200 mg d'O_2/l) puis ces fortes valeurs momentanées baissent considérablement atteignant 598 mg d'O_2/l en 1963, 380 mg en 1964 et 347 en 1965.

Les puits F3 et F5 (tableau n° 9), à l'extrémité Ouest en dehors des limites du terrain, présentent une évolution identique. Quant au puits F4, situé entre les deux précédents, son évolution est difficile à interpréter : l'oxydabilité de 330 mg d'O_2/l en 1962 diminue de façon très notable l'année suivante (56 mg d'O_2/l) et jusqu'à la fin de nos observations, il n'est alimenté que par des eaux faiblement oxydables (138 mg d'O_2/l en 1970).

A l'Est de la ligne des puits 7, les fluctuations de l'oxydabilité des eaux prélevées au puits 3B (figure 16) rappellent celles du 7B situé à la même distance de 180 m de l'épandage. Les teneurs décroissent du mois de juin 1962 au mois de novembre 1965, si l'on excepte de faibles variations de sens contraire en février 1964 et janvier 1965. Elles augmentent faiblement en 1967 et parviennent à 440 mg d'O_2/l, valeur nettement inférieure à celle relevée au puits 7B à la même date.

Des modifications chimiques similaires s'observent aux puits 3C et 5C, à 260 m du lieu de l'infiltration (figures 16 et 17). Cependant,en examinant les courbes, on constate au puits 3C, de janvier 1962 à mars 1963, une teneur en substances oxydables constante alors que dans les autres puits les

valeurs maxima ne durent pas. On peut également noter l'absence de remontée en 1967.

Des variations de nature semblable surviennent plus tardivement au puits 3D, localisé à 340 m (figure 16). Au cours de l'année 1962, l'oxydabilité, très faible, oscille entre 48 et 62 mg d'O_2/l. En 1963, elle augmente fortement de même que le pH et la coloration, le maximum de 790 mg d'O_2/l se situe en septembre 1963. Ensuite, les eaux se décolorent et perdent de leur pouvoir réducteur.

Les observations relatives aux puits 5D et 1D (figure 17)confirment ces résultats.

A l'extrémité Est du terrain, en raison de l'éloignement du lieu de l'épandage, les eaux en voie d'épuration ne parviennent aux puits 1 à 4E qu'en 1963 - 1964 (tableau n° 9). La demande en oxygène s'élève constamment jusqu'en 1965 (360 mg d'O_2/l au puits 1E, 116 mg d'O_2/l au 4E) et faiblit en 1967 surtout aux puits 2E et 3E et en 1970 au puits 4E.

Enfin, les puits F6, F8 et 2D, en bordure du terrain présentant des fluctuations difficiles à interpréter.

Les figures 18 à 23 matérialisent, au moyen de trames en dégradés, les variations moyennes annuelles de l'oxydabilité des eaux prélevées en différents points du terrain. Elles sont obtenues, d'une part, en répartissant les demandes chimiques en oxygène en cinq catégories : de 0 à 100 mg d'O_2/l, de 100 à 200, de 200 à 400, de 400 à 700 et de 800 à 1 200 mg d'O_2/l et, d'autre part, en réunissant tous les puits dont les eaux appartiennent à la même catégorie.

En 1962 (figure 18), les eaux résiduaires non épurées cheminent suivant deux directions principales : l'une orientée vers le Nord parvenant au puits F3, l'autre en direction Sud-Ouest/ Nord-Est vers l'Eyre atteignant le puits 1D. Elles occupent alors une région délimitée par les puits 11, 7, F7, 1D, F3 et F5. La teneur en substances oxydables varie entre 400 et 680 mg d'O_2/l c'est-à-dire inférieure à celle de l'effluent rejeté antérieurement. Comme il s'avère très difficile d'apprécier les durées d'infiltration et de stagnation des eaux dans le sol, la comparaison doit être prudente.

A l'intérieur du périmètre concrétisé par les puits précédemment énumérés, on constate qu'une région, délimitée par les puits 9C, 7B, 3B, 5C et 3C, renferme des eaux dont la couleur et la concentration en substances oxydables , de 983 à 1 207 mg d'O_2/l, surpassent très largement celles des liqueurs noires déversées. Elles proviennent selon toute vraisemblance du lessivage de l'humus dans la région située au Sud.

En avant des limites du front de la nappe d'eaux résiduaires non totalement épurées, les liquides tendent à se rapprocher des caractéristiques de l'eau naturelle. Les résultats relevés aux puits F8 (185 mg d'O_2/l), 5D (156 mg d'O_2/l) et 7E (100 mg d'O_2/l) font penser à l'implantation d'un

processus biologique d'épuration. Plus avant, et compte tenu des remarques déjà formulées concernant l'accumulation et la progression des eaux dans le sol, les puits 2D, 1E et TD sont alimentés par des eaux totalement épurées.

L'année suivante (figure 19), les eaux résiduaires faiblement épurées progressent vers l'Est et atteignent les puits 3D, 5D et 1D.

Les valeurs d'oxydabilité permettent de distinguer trois zones :

- la première concerne les puits 7, 11 et F5 dont la demande chimique varie entre 220 et 352 mg d'O_2/l.

- la seconde renferme des eaux fortement chargées en matières organiques. Par rapport à l'année 1962, cette nappe se déplace vers le Nord et perd de l'importance en surface puisqu'elle n'affecte plus que les puits 7D, 3C, 5C et 3D, et en composition : l'oxydabilité n'est comprise qu'entre 788 et 955 mg d'O_2/l.

- la dernière zone recèle des eaux de 400 à 700 mg d'O_2/l. On remarque également que les liqueurs noires en voie d'épuration, c'est-à-dire celles ne renfermant que de 100 à 200 mg de substances oxydables par litre, progresse à l'Est et au Sud-Est du terrain (puits F7, 2D, 1E).

En 1964, (figure 20), l'avancée de la nappe souterraine d'eaux résiduaires en partie épurées gagne vers l'Est les puits F6, 2E et 3E (oxydabilité de 111 à 180 mg d'O_2/l au lieu de 80 en 1963). Les très fortes valeurs d'oxydabilité n'existent plus, les valeurs maxima (de 440 à 649 mg d'O_2/l) sont seulement notées dans la région des puits 7D, 3B, 5C, 1D, 5D et 3D. Les liquides prélevés sur la majeure partie du terrain ont une composition sensiblement homogène, allant de 244 mg d'O_2/l au puits 7E à 400 mg au puits 7 nettement inférieure à celle de l'effluent (558 mg d'O_2/l en 1962, 520 en 1963, 613 en 1964).

L'année suivante (figure 21), la région renfermant les liqueurs noires en partie épurées s'agrandit vers l'Est (puits 4E) et au Nord-Est (puits TD). L'ensemble des valeurs d'oxydabilité baisse ; seuls les puits 7D, 3C et 3D renferment encore des eaux de 414 à 540 mg d'O_2/l. Cependant, on remarque, en bordure de l'épandage (puits 7, 11), l'apparition d'un phénomène nouveau : la teneur en matières organiques augmente, conséquence du rejet d'effluents concentrés.

En 1967 (figure 22), la zone d'eaux en cours d'épuration progresse du Nord-Est vers le Sud-Ouest : les puits TD, 3D, 1D, 1E, 3E, 4E, 2D et F6 ne contiennent que de 100 à 200 mg/l de matières oxydables.

A l'arrière d'une ligne joignant les puits F7, F8, 5C, 3C et 7E, les eaux à forte oxydabilité réapparaissent notamment aux puits 21, 7B et 7D (770 à 1 140 mg d'O_2/l). Cette particularité s'explique par le rejet, en 1966-1967, d'un volume considérable (1 million de m3) d'effluents concentrés. Il semble, alors, que l'écoulement des eaux s'opère de façon préférentielle vers le Nord et non plus en direction de la rivière.

Enfin, la figure 23 (premier semestre 1970), très voisine de celle établie pour l'année 1965, traduit le retour à un état d'équilibre et montre l'existence de phénomènes d'épuration efficaces.

En résumé, deux phénomènes bien distincts se manifestent :d'une part, la progression des eaux résiduaires dans le sol conditionnée par le débit d'effluents rejetés et, d'autre part, la mise en oeuvre d'un processus d'épuration dépendant de l'efficacité des actions microbiennes. Ce dernier phénomène s'intensifie au cours des années. Il convient d'éviter le rejet de liqueurs noires concentrées perturbant profondément, et pendant une durée assez longue, l'équilibre biologique.

2 - Teneur en azote

Les eaux résiduaires de papeterie, pratiquement carencées en azote, ont une teneur moyenne de l'ordre de 3 mg par litre de 1962 à 1965,légèrement plus élevée en 1961 (4,70 mg/l). La nappe phréatique en renferme de 0,25 à 0,50 mg par litre.

L'étude des variations de la concentration en matières azotées, généralisée à l'ensemble du terrain, débute en 1962 ; les résultats sont consignés dans le tableau n° 10. A cette date, les valeurs, très voisines des dosages effectués à partir des eaux des puits 7, 18 et 21, se situent entre 3,60 et 4,30 mg et proches de celles de l'effluent déversé en 1961 (4,70 mg/l). On remarque également, par rapport aux mesures fragmentaires de 1961, une très nette diminution.

L'année suivante, les teneurs faiblissent de manière identique dans les trois puits et avoisinent 3,50 mg/l.

En 1964, les eaux évoluent peu et se stabilisent, sauf au puits 7 où l'on note une remontée entre 5,60 et 5,90 mg/l à la reprise de l'épandage en bassins, au mois de septembre, concomitante d'une élévation de coloration.

En 1965, la teneur en azote, homogène, rappelle celle de l'effluent tandis qu'en 1970 (premier semestre), elle en demeure nettement inférieure (2,10 mg au puits 7, 2,40 mg au puits 18).

Au puits 7B,foré à 180 m au Nord de l'épandage, les concentrations augmentent par rapport aux puits précédents et atteignent 8 mg/l en 1961 puis baissent régulièrement à 5,50 en 1962 et oscillent entre 2,80 et 3,30 mg/l de 1963 à 1965. En 1970, les valeurs augmentent à 5,00 mg/l.

L'évolution au puits 7D diffère légèrement. Les teneurs de l'ordre de 2,50 mg/l en 1961, inférieures à celles de l'effluent, augmentent l'année suivante et parviennent à 5 mg/l puis diminuent de 1963 à 1965 à 3,50mg/l.

Comme au puits 7, une remontée se manifeste en 1964. Cette évolution des matières azotées rappelle celle de la coloration.

Les eaux prélevées au puits 7E contiennent très peu d'azote,environ 1 mg/l, en 1962. Les valeurs s'accroissent progressivement de 2,70 à 4,25 mg/l en 1963 et 1964 et baissent ensuite pour atteindre celle des puits déjà cités.

Au puits FF, les eaux présentent les caractéristiques de la nappe phréatique (0,25 à 0,70 mg/l).

En résumé, suivant la ligne des puits 7, les eaux s'enrichissent en substances azotées surtout en 1961 et 1962. Les valeurs maxima interviennent jusqu'à 340 m de l'épandage. Au cours des années suivantes, elles baissent et demeurent égales ou inférieures à la composition de l'effluent. Le puits 7E, plus éloigné, touché par la nappe d'eaux résiduaires en voie d'épuration pendant l'année 1962, est en constante augmentation jusqu'en 1964 puis les valeurs diminuent.

A l'Ouest de cette ligne, les eaux prélevées au puits 9C s'appauvrissent en azote de 6,75 à 3,70 mg/l. Quant aux puits F3 et F5, les concentrations constantes et comparables à celles des eaux résiduaires épandues se situent entre 2,50 et 3,20 mg/l excepté en 1970 au puits F3 (4,30 mg/l). Le puits F4, bien que voisin des précédents, renferme des eaux très faiblement azotées (0,75 à 1,80 mg/l).

Suivant la ligne des puits 3, la quantité d'azote diminue régulièrement, de 1962 à 1965, de 7,10 à 3,40 mg/l au puits 3B. Cette baisse s'accompagne d'une décoloration des eaux ainsi que d'une perte d'oxydabilité. En 1970, on note une remontée à 4,90 mg pour des eaux nettement plus colorées et oxydables.

La même évolution se produit au 3C mais les valeurs baissent très lentement de 1962 à 1964 (de 7 mg à 6,40 mg/l) et demeurent, en 1965 et en 1970, encore nettement supérieures à celles de l'effluent.

Le puits 3D subit les mêmes variations que le 7D, tous deux localisés à 340 m de l'épandage. En 1962, les valeurs très faibles, de l'ordre de 1 mg/l, augmentent fortement en 1963 atteignant 5 mg en juin et 7,30 mg/l en mars 1964 puis diminuent de 1965 à 1970 et se stabilisent à 3,20 mg/l.

Le puits TD, à l'extrémité Nord de la ligne des puits 3, recueille de 1962 à 1965, une eau pauvre en azote. En 1962, les teneurs de 0,30 mg/l caractérisent la présence d'eau naturelle ; elles augmentent ensuite, parvenant après des fluctuations à une concentration de 2,80 mg/l.

Les résultats des prélèvements réalisés suivant la ligne des puits 5 s'identifient à ceux de la ligne 3. Ainsi, les variations au puits 5C ressemblent à celles du 3C. De même, au puits 5D, analogue au 3D, le taux en

substances azotées augmente de 1962 à 1964 de 1,20 à 5,40 mg/l puis diminue (3,90 mg/l en 1965, 2,80 mg/l en 1970). La même évolution s'observe au puits 1D.

A l'extrémité Est du terrain d'épandage, les eaux des puits 2D et 1 à 4E s'enrichissent en azote mais les valeurs sont toujours inférieures à celles des liqueurs noires déversées.

Les eaux des puits F6 contiennent peu d'azote, avec un maximum à 1,70 mg/l en 1964 et 1965. Les dernières mesures de 1970 indiquent une teneur de 0,30 mg/l.

Enfin, le puits F7, plus proche de l'épandage,s'appauvrit en matières azotées de 1962 à 1970 (3,40 mg/l à 1,60 mg/l).

En conclusion, l'enrichissement en azote, semble d'autant plus grand et plus rapide que le prélèvement est plus proche du lieu de l'infiltration. Dans tous les cas, il n'est que de courte durée puisque les valeurs se situent ensuite nettement en dessous de celles de l'effluent.

On remarque que les eaux à teneur élevée en azote sont généralement colorées et fortement oxydables. Les variations similaires de la coloration, de l'oxydabilité et de l'azote incitent à penser qu'elles dépendent d'un facteur commun vraisemblablement représenté par les matières humiques du sol. L'humus brut du type mor peut, à l'état dispersé, enrichir les liquides du sol en azote.

La possibilité, qui a pu être envisagée, d'une fixation biologique d'azote par les micro-organismes se conçoit difficilement car elle ne peut expliquer les hausses passagères. En outre, les résultats de cultures microbiologiques effectuées à partir d'eaux prélevées en différents points du terrain n'ont pas prouvé un enrichissement en azote, même après une incubation de trois mois.

A partir de 1965, l'ensemble des valeurs est inférieure à celles de l'effluent mettant en évidence des phénomènes d'épuration. Les remontées observées en 1970 peuvent être la conséquence de rejets de liqueurs noires concentrées.

3 - Teneur en sodium

De 1959 à 1964, plus de 1 500 000 m3 de liqueurs noires dont la teneur en sodium varie de 0,185 à 0,431 g/l ont été déversés. L'ion sodium n'a pas été dosé de façon systématique, mais son évaluation a été effectuée dans le but de prévoir des phénomènes de toxicité dus à son accumulation dans le sol. Les observations s'étendent sur deux années, 1964 et 1965,et sont résumées dans le tableau n° 11.

Pendant la première année, la composition en sodium de l'effluent, relativement stable, ne varie qu'entre 0,165 et 0,230 g/l. L'année suivante, parallèlement à une augmentation de la couleur et de la demande chimique en oxygène, la concentration en sodium s'élève de 0,141 à 1,087 g/l.

Au puits 7, de septembre à décembre 1964, le taux de sodium baisse régulièrement de 0,215 à 0,140 g/l, de même que l'oxydabilité,puis augmente de 0,140 à 0,176 g/l de mars à juillet 1965. Ces variations coïncident également à celles de la coloration.

En tenant compte des moyennes annuelles, on constate que les eaux infiltrées au puits 7 s'appauvrissent en sodium de 0,171 à 0,152 g/l de 1964 à 1965. Les valeurs relevées demeurent inférieures à celles de l'effluent. On peut envisager une fixation dans le sol des sels de sodium sur le complexe absorbant avec remplacement des ions H^+ par des ions Na^+.

Au puits 18, les résultats, comparables à ceux du puits 7, indiquent des teneurs identiques au cours des deux années d'analyse (0,168 g/l).

Au puits 21, les eaux s'enrichissent légèrement en sodium avec une valeur moyenne de 0,194 g/l en 1964. L'année suivante, les résultats faiblissent (0,159 g/l).

C'est au puits 7B, situé à 180 m du lieu de l'épandage,que les teneurs en sodium sont les plus élevées de tous les prélèvements effectués selon la ligne des puits 7. En 1964, elles dépassent celles de l'effluent (0,210 g/l) puis diminuent l'année suivante. Des variations de sens contraire s'observent au puits 7D : la concentration en sodium s'élève de 0,197 à 0,214 g/l.

Quant au puits 7E, les teneurs diminuent de 0,130 à 0,078 g/l au cours de l'année 1964, baisse accompagnée d'une décoloration des eaux et d'un appauvrissement en matières oxydables et en substances azotées. En 1965, les valeurs augmentent d'avril à mai parvenant à 0,130 g/l puis diminuent en automne (0,065 g/l).

Une fois de plus, on remarque que la similitude des variations entre coloration, oxydabilité, azote et sodium.

Le puits FF, à l'extrémité Nord, alimenté en eau naturelle ne contient que très peu de sodium (0,017 g/l).

Suivant la ligne des puits 7, les valeurs augmentent donc lorsque l'on s'éloigne du lieu de l'infiltration et deviennent maxima au puits 7B en 1964 et au puits 7D en 1965 puis diminuent.

A l'Ouest de cette ligne, les eaux du puits 9C se comportent de façon identique à celles du puits 7B.

En bordure du ruisseau, les eaux des puits F3 et F5 ont une concentration allant de 0,131 à 0,138 g/l donc nettement inférieure à celle des liqueurs noires déversées. Le puits F4, en 1965, renferme des eaux dont la teneur se rapproche de celle de l'eau naturelle (0,029 g/l).

Les résultats des prélèvements effectués sur la rive opposée confirment une nouvelle fois que les eaux résiduaires n'ont pas franchi le lit du ruisseau.

Suivant la ligne des puits 3, la concentration en sodium au 3B diminue de 0,292 à 0,234 g/l en 1964, la baisse se maintient en 1965 (0,246 g/l). Les eaux du 3C présentent des variations de même nature. La diminution s'accompagne d'une décoloration des eaux et d'un appauvrissement en matières organiques et en azote.

Le puits 3D suit une évolution comparable à celle du 7D, situé 100 m à l'Ouest.

Le puits TD, terminant la ligne des puits 3, renferme des eaux naturelles en 1964 (0,019 g/l) ; les valeurs doublent en 1965 indiquant une progression de la nappe.

Les puits 5C et 5D, à l'Est de la ligne 3, subissent une perte en sodium de 0,216 à 0,164 g/l au cours des deux années d'observation.

A l'extrémité Est du terrain, à l'exception du puits 1D dont les valeurs uniformes se situent aux environs de 0,160 g/l, les eaux prélevées possèdent une teneur qui, de très faible en 1964, augmente en 1965 (puits 1 à 4E).

Aux puits F6 et F7, les échantillons analysés contiennent peu de sodium (0,027 à 0,052 g/l).

En comparant la totalité des résultats groupés dans le tableau n° 11, on remarque qu'au cours de l'année 1964, les teneurs légèrement supérieures à celles de l'effluent sont relevées aux puits 7B, 3B, 3C, 5C et 5D, constituant un ensemble orienté Sud-Ouest Nord-Est. Compte-tenu des déversements antérieurs de liqueurs noires, il n'y a donc pas d'accumulation de sodium dans le sol. Les valeurs les plus élevées, précédemment signalées, ne peuvent en aucun cas entraver le développement d'une microflore épuratrice. Du point de vue biologique, le sodium n'est pas un élément nutritif ; cependant sa présence dans les milieux de culture s'avère nécessaire car ses sels permettent d'assurer une pression osmotique correcte. La concentration optimum est de 2 grammes par litre (solution de chlorure de sodium 0,085 M) créant une pression osmotique d'environ 4 atmosphères correspondant à celle des bactéries à Gram négatif (la seconde catégorie de micro-organismes possède une pression osmotique plus élevée : 15 à 25 atmosphères). Donc, jusqu'à concurrence de 2 g de sodium par litre, chiffre loin d'être atteint, les phénomènes de toxicité ne sont pas à craindre.

En 1965, malgré l'épandage de liqueurs noires plus concentrées, on ne note aucune accumulation dans les solutions du sol. Il convient de préciser une nouvelle fois que la durée de l'infiltration du lieu de l'épandage à celui de prélèvements dépend de nombreux facteurs : distance, débit, pluviosité.

On doit admettre que le sodium est entraîné dans le mélange eaux naturelles - liqueurs noires. Une partie peut être fixée sur le complexe absorbant mais à la faveur de fortes pluies, limitant les apports d'eaux résiduaires, le lessivage du sol intervient ayant pour conséquence l'élimination des bases, fait confirmé par les remontées de pH.

L'ion sodium, très mobile dans le sol et n'étant pas métabolisé par les micro-organismes, permet de suivre la progression des eaux résiduaires, par exemple enrichissement aux puits 1 à 4E de 1964 à 1965 et appauvrissement en sodium dans les autres puits.

Il semble également que la coloration des eaux, leurs teneurs en matières oxydables, en azote et en sodium soient sous l'influence de facteurs identiques, les variations étant parallèles.

D - SYNTHESE DES RESULTATS

Les calculs faisant intervenir la surface du terrain d'épandage et le débit de l'effluent, déjà exposés lors de l'étude de la coloration, ont prouvé que les liqueurs noires ne pouvaient s'accumuler dans le sol et qu'après avoir subi une épuration biologique, devaient être éliminées, à la façon des eaux naturelles, sans que l'on puisse détecter leur présence. On doit admettre, notamment pour l'interprétation de la figure 24, que les eaux résiduaires, détectées sur le terrain par leurs caractéristiques physico-chimiques, sont en voie d'épuration, le degré d'épuration grandissant avec la distance qui les sépare du lieu de l'épandage.

La figure 24 représente le cheminement dans le sol des eaux résiduaires en voie d'épuration.

Après un an d'épandage correspondant au rejet de 300 000 m3 de liqueurs noires, les eaux en voie d'épuration parviennent à une distance d'environ 200 mètres au Nord du dernier drain.

L'année suivante, en 1961, elles progressent irrégulièrement surtout au Nord où l'avancée est de 200 m et à l'Est de 80 m.

Le nombre restreint de puits examinés, pendant cette période, permet seulement de constater qu'après infiltration, sur une très faible distance, les eaux atteignent la neutralité puis subissent peu de modifications.

En 1962, malgré l'apport d'un volume considérable d'effluent (500 000 m3), la progression demeure faible et se fait régulièrement à l'Est comme à l'Ouest. Il convient de remarquer avec SECHET (204) que l'avance de ces eaux ne semble proportionnelle ni aux durées considérées ni aux volumes rejetés. Elle paraît ralentir à mesure que le front s'éloigne de l'épandage vraisemblablement par instauration d'une épuration biologique de plus en plus efficace.

On constate que le terrain d'épandage peut être divisé en trois zones :

La première, allant du lieu de l'infiltration aux puits 9C, 7B, 3B et F8, renferme des eaux de pH neutre ou légèrement alcalin (7,30 à 7,70) et dont l'oxydabilité, nettement inférieure à celle des effluents déversés antérieurement (de 826 à 960 mg d'O_2/l), varie de 440 à 500 mg d'O_2/l. La teneur en azote, de 3,60 à 4,30 mg/l, reflète les caractéristiques des liqueurs noires épandues.

On peut penser que cette zone contribue largement à l'épuration, ne serait-ce que par la très nette diminution de la demande chimique en oxygène.

La seconde zone intéresse les puits 9C, 7B, 3B, 5C, 3C et 7D. Les eaux infiltrées s'acidifient légèrement (pH de 6,70 à 7) et ont une très forte oxydabilité allant de 700 à 1 200 mg d'O_2/l, très nettement supérieure à celle de l'effluent. Parallèlement, on note un enrichissement en azote, les teneurs variant de 5 à 8,20 mg/l. L'acidification des eaux, leur augmentation en azote et en substances oxydables semblent indiquer l'existence de processus physico-chimiques consistant principalement en un lessivage de l'humus du sol par les eaux résiduaires alcalines et à leur accumulation.

La dernière zone du terrain, située à l'Est, reçoit des eaux acides, très faiblement réductrices et dont la concentration en azote oscille entre 0,25 et 0,60 mg/l. Ces eaux, compte-tenu des réserves déjà signalées, ont subi l'épuration et se confondent avec les eaux naturelles.

On peut donc conclure, qu'en 1962, deux phénomènes étroitement intriqués se déroulent dans le sol : le premier consiste en la mise en oeuvre d'une épuration biologique, le second, d'origine physico-chimique, réside dans la dispersion et la migration des composés humiques.

En 1963 (90 000 m3 de liqueurs noires rejetées), la progression du front de la nappe des eaux en voie d'épuration est très faible et n'intéresse que la partie Est du terrain. Les trois régions subsistent.

La première gagne, vers le Nord, les puits 9C, F3 et 7B. Par rapport à l'année précédente, les pH subissent peu de modifications et se situent entre 7,15 et 7,80 (moyenne 7,30). Les demandes chimiques en oxygène évoluent peu (411 à 527 mg d'O_2/l). Cependant, il faut noter une forte perte d'oxydabilité aux puits 9C et 7B (de 1 207 à 598 mg pour le premier et de 983 à

441 mg d'O_2/l pour le second. La teneur en azote faiblit et oscille entre 2,80 et 3,50 mg/l, ce qui correspond approximativement aux valeurs des liqueurs noires épandues. Les eaux sont très légèrement surcolorées avec des indices allant de 6 à 10.

La deuxième zone se déplace vers l'Est, délimitée par les puits 7D, 3B, 5C, 1D, 5D et 3D. Comme précédemment, les pH sont nettement acides (de 5,80 à 6,60) et les eaux très fortement colorées (indices de 21 à 27). Les teneurs en substances oxydables et en azote, tout en demeurant supérieures à celles de l'effluent, marquent une baisse très sensible aux puits 9C, 7B, 3B et 5C tandis que les puits 3D, 5D et 1D, situés à 80 m au Nord, se colorent fortement et s'enrichissent en ces mêmes substances.

Il semble donc qu'au cours de l'année 1963, on assiste à un déplacement du front des eaux colorées, à la manière d'une onde se propageant vers le Nord. Les dosages d'oxydabilité et d'azote indiquent qu'en se déplaçant, cette nappe se dilue vraisemblablement par de nouveaux apports de liqueurs noires et par les eaux naturelles.

Le lessivage des matières humiques semble s'atténuer. On peut supposer que, de 1959 à 1963, cette zone surcolorée s'est déplacée en direction Nord-Nord-Est, à partir du lieu de l'infiltration.

La troisième zone, à l'Est, renferme des eaux acides de pH 5,05 à 5,95 et faiblement colorées (0 à 4). La teneur en azote s'élève légèrement et oscille entre 0,6 et 1,6 mg/l. L'oxydabilité bien qu'en augmentation demeure inférieure à 130 mg d'O_2/l.

En 1964, la distinction entre les trois zones est beaucoup plus subtile ; les différences s'amoindrissent et il semble que l'on s'achemine vers une homogénéisation des eaux sur l'ensemble du terrain. Exception faite du puits 5D, les eaux de pH voisin de la neutralité et faiblement colorées (indices 6 à 10) paraissent de composition homogène. L'analyse révèle une oxydabilité comprise entre 281 et 512 mg d'O_2/l nettement inférieure à celle de l'effluent. Les teneurs en azote, supérieures à celles des liqueurs noires déversées, oscillent entre 3,20 et 3,60 mg/l. La concentration en sodium n'entrave pas les processus biologiques puisqu'elle est égale ou légèrement inférieure à celle de l'effluent.

La zone caractérisée par la présence d'eaux colorées se réduit et n'affecte plus que les puits 3C, 3D et 5D. Les pH augmentent légèrement et varient de 6,25 à 6,50. Comparées avec celles de 1963, les colorations et les demandes chimiques en oxygène diminuent. L'oxydabilité la plus élevée est notée au puits 3C (649 mg d'O_2/l) de même que la teneur en azote (6,4 mg/l)et l'on enregistre un enrichissement des eaux en sodium.

Les eaux des puits, situés à l'Est de cette dernière zone, de réaction nettement acide (4,95 à 5,80), se colorent, s'enrichissent en substances oxydables (maximum de 180 mg d'O_2/l) et en azote (2,25 mg/l).

La teneur en sodium,très faible de 0,019 à 0,050 g/l mais cependant supérieure à celle de l'eau naturelle de la région indique bien que ces puits subissent l'influence des eaux résiduaires.

L'évolution, en 1965, est comparable à celle de l'année précédente. En direction de l'Eyre, les eaux s'acidifient légèrement. Malgré l'apport d'effluents fortement chargés en matières organiques à partir du mois de juin, les demandes chimiques en oxygène restent stationnaires (229 à 481 mg d'O_2/l) de même que les colorations (5,5 à 12). La teneur en azote baisse légèrement (2,5 à 4,3 mg/l), celle en sodium varie de 0,094 à 0,246 g/l. Les puits 3C et 3D constituent les derniers témoins de la zone fortement colorée. Malgré tout, ces eaux dont le pH tend vers la neutralité (6,50 à 6,65) perdent de leur couleur, de leur oxydabilité (500 à 540 mg/l). Azote et sodium marquent une baisse sensible.

Les autres puits, mis à part le FF non atteint par les liqueurs noires, contiennent des eaux dont le pH et les colorations s'élèvent par rapport à 1964. L'oxydabilité augmente surtout dans la série des puits E atteignant 360 mg/l de même que la teneur en azote et en sodium.

Cependant, si l'on compare l'évolution de l'oxydabilité sur l'ensemble du terrain pendant les années 1964 et 1965, on note un recul du front des eaux à forte oxydabilité qui n'est plus délimité en 1965 que par les puits 9C, 7D, 3D, 3C et 3B. Ce phénomène, comme nous l'avons signalé lors de l'étude des variations d'oxydabilité, traduit l'existence d'un processus d'épuration dont l'efficacité semble augmenter avec le temps.

En 1967, le pH des eaux prélevées sur l'ensemble du terrain s'uniformise entre 6,20 et 7,20. On relève suivant la ligne des puits 7,c'est-à-dire en direction Nord, des eaux très fortement colorées à oxydabilité très élevée. La majorité des autres puits a une demande chimique et une coloration en baisse (3C, 3D, 1D, série des E) ; seuls les puits F6 et F7 sont en augmentation. La réapparition d'eaux très colorées ne peut s'expliquer que par les rejets antérieurs d'effluents très concentrés qui progressent dans le sol vers le Nord, l'écoulement en direction de l'Eyre étant impossible sans doute à la suite de fortes précipitations en 1965 et 1966.

Les résultats des dernières analyses de 1968 et 1970 indiquent des eaux de pH 6,30 et 6,95. L'oxydabilité est nettement plus faible que les années précédentes ; les valeurs les plus fortes ne dépassent pas 580 mg d'O_2/l (puits 3C) et sont localisées sur une faible partie du terrain délimitée par les puits F3, 7B, 3B, 5C, 1D, 5D et 7D. A l'Est, l'oxydabilité baisse notamment dans les eaux prélevées aux puits F7, F6 et 4E.

En règle générale, le sens préférentiel d'écoulement des eaux se fait, à partir de l'épandage, en direction Sud-Ouest-Nord-Est vers l'Eyre suivant la pente naturelle du terrain et concerne les puits 7, 18, 21, 7B, 3B, 5C, 1D et 1E. Après une période de fortes pluies, la rivière peut alimenter la nappe phréatique inversant le sens d'écoulement qui s'effectue, alors,vers le Nord.

L'ensemble de ces résultats traduit la réalité de l'existence du processus d'épuration. Le sol "organisme vivant" réagit aux profonds bouleversements qui l'affectent. Si les phénomènes biologiques s'instaurent lentement, on constate une fois de plus, leur efficacité qui, d'ailleurs,augmente d'année en année.

Chapître II

INTERACTIONS SOL-EFFLUENT

——————oo——————

L'interprétation des variations physico-chimiques de l'effluent lors de son infiltration dans le sol s'avère très délicate par la mise en jeu de nombreux paramètres. Pour comprendre les mécanismes, tant physique que chimique, une expérimentation en laboratoire s'impose. Elle consistera principalement dans l'examen des variations de pH et de coloration, en utilisant un dispositif d'infiltration de surface réduite, et dans l'étude des relations existantes avec les différents constituants du sol.

A - VARIATIONS DE pH ET DE COLORATION

Les variations des caractéristiques physiques des eaux infiltrées dépendent principalement de la nature du sol, en faisant abstraction, volontairement pour l'instant, de l'influence de l'activité bactérienne.

L'emploi d'un dispositif d'infiltration, à l'échelon laboratoire, permet d'étudier les variations de pH et de coloration en fonction des différents horizons du sol.

1 - Dispositif expérimental d'infiltration

Une colonne cylindrique, en "Lucoflex", de 2 m de hauteur et de 15 cm de diamètre, percée sur une de ses génératrices par des tubes disposés tous les 10 cm (18 tubes au total identifiés de A à R), est remplie des différents constituants du sol répartis en couches successives de manière à reproduire, aussi fidèlement que possible, la configuration moyenne des différents horizons du terrain d'épandage (figure 25) : terre arable, (horizons A_0 et A_1), sable (horizon éluvial A_2), zones d'accumulation d'humus et de fer (horizons illuviaux B_1 et B_2) et sable (horizon C).

Après saturation avec 10 litres de liqueurs noires, l'ensemble est mis en fonctionnement : l'alimentation s'opère avec des eaux résiduaires de pH 10 à 11 et d'indice de coloration de 11 à 12, introduites à la partie

supérieure, à l'aide d'un goutte à goutte calibré à raison de 33 ml/heure,ce qui correspond approximativement à un épandage de 2 litres/m2/h. Tout le dispositif se trouve placé à la température de 18 à 20°C.

Au départ, pendant la première semaine (tableaux n° 12 et 13),les eaux, recueillies à la sortie (Q et R) de la colonne, s'acidifient mais n'atteignent pas la neutralité (pH de 7,80 à 8). L'analyse des prélèvements aux niveaux E et F indique une acidification très marquée après infiltration dans la terre arable tandis que la décoloration se manifeste à tous les niveaux.

Après une semaine d'épandage, les liquides s'acidifient et sont surcolorés. Le pouvoir acidifiant de la terre arable diminue considérablement (pH de 6,80 et 6,40 en E et F, au lieu de 4,80). L'abaissement de pH s'accentue pendant la traversée des horizons d'accumulation d'humus et de fer puis les valeurs se stabilisent au niveau inférieur de sable.

Les colorations les plus élevées (indices 38 à 46) s'observent pendant la troisième semaine d'expérimentation et intéressent les horizons d'accumulation B_1 et B_2 ainsi que les niveaux J et K qui leur font suite.Les pH accusent une très légère remontée.

Un phénomène nouveau apparaît dans la partie inférieure de la colonne (niveaux N à R) après un mois de fonctionnement. La coloration augmente de même que les pH qui tendent à s'élever de 0,2 à 0,3 unité. On décèle, lors des prélèvements, une forte odeur d'hydrogène sulfuré, résultant de l'activité de micro-organismes anaérobies sulfato-réducteurs. La sulfato-réduction alcalinise le sol : elle donne naissance, à partir des sulfates contenus dans les liqueurs noires,à des sulfures, notamment des sulfures de sodium,qui s'hydrolysent suivant la réaction :

$$Na_2 S + 2 H_2 O \longrightarrow H_2 S + 2 Na OH$$

L'hydrogène sulfuré se dégage et l'hydroxyde de sodium formé élève le pH du sol.

L'augmentation de la couleur s'explique également par la sulfato-réduction. L'horizon B_2 ("alios jaune") étant un lieu d'accumulation de sels de fer, on peut envisager la production de sulfure de fer, de couleur noire, qui assombrit la teinte.

De la cinquième à la dixième semaine, peu de changements interviennent. Cependant, on constate que la neutralisation des liqueurs noires s'opère après une infiltration de plus en plus grande jusqu'à la sortie de l'horizon B_2 qui acidifie de façon durable.

Après environ 70 jours de fonctionnement, tout prélèvement, à quelque niveau que ce soit, devient impossible : les liqueurs ne filtrent plus à travers la colonne ; les différentes terres ont perdu leur perméabilité par complet colmatage.

L'étude en laboratoire de ce dispositif d'infiltration permet de faire les remarques suivantes :

Le pouvoir tampon diffère fortement selon les différents horizons du sol. Très faible et pratiquement nul dans le sable (horizon A_2 et C), il s'élève dans la terre arable mais son action ne dure pas. La capacité totale d'échange maximum se rencontre dans les horizons illuviaux B_1 et B_2 qui représentent le véritable complexe absorbant de ce sol. La proportion de matière organique et surtout d'humus, en d'autres termes le degré d'humification, augmente donc le pouvoir tampon.

La surcoloration des eaux se produit après infiltration sur terre arable, par dispersion et migration de substances humiques à l'état d'humates alcalins, mais surtout dans les horizons d'accumulation d'humus et de fer, par dispersion de l'humus sous l'influence d'eaux à réaction acide.

Les conditions d'anaérobiose et la présence de sulfates dans les eaux résiduaires instituent un facteur favorable au développement de germes sulfatoréducteurs qui, par leurs produits de catabolisme, élèvent le pH et augmentent la couleur des eaux infiltrées.

Après un arrêt de quelques mois, la colonne est lessivée à l'aide de 3,5 l d'eau distillée. Les prélèvements effectués en R indiquent, alors, un pH de 8,70 et une coloration de 14 tandis qu'aux niveaux les plus proches de la surface, les eaux très faiblement colorées (indice 1,5) avoisinent la neutralité. Ces faits concordent avec ceux observés sur le terrain d'épandage : après le lessivage naturel du sol pendant l'hiver 1960-1961, exceptionnellement humide les eaux s'alcalinisent et se surcolorent.

2 - Etude analytique de l'infiltration

Dans le but de préciser le rôle imputable aux différents constituants du sol dans la surcoloration et les variations de pH, une expérimentation analytique est entreprise sur des colonnes de verre, de 50 cm de longueur et de 20 mm de diamètre, dont la partie inférieure, obturée, permet cependant d'effectuer des prélèvements (figure 25).

Chaque tube renferme les éléments d'un horizon du sol déterminé.

Une série comprend quatre colonnes constituées par :

- terre arable
- "alios noir", riche en humus et présentant un début de formation aliotique.
- "alios jaune" où s'accumule le fer
- sable (horizon C)

L'ensemble est alimenté à l'aide d'un milieu de Starkey stérile de pH 7,50, ne présentant aucune coloration. Le tableau suivant résume l'ensemble des résultats obtenus.

Apparition de l'activité bactérienne ▼

Jours / Horizons		1	2	3	5
Milieu d'alimentation	pH	7,50			
	Col.	0			
Terre arable	pH	4,20	4,40	4,60	4,70
	Col.	0	1	14	3
Allos noir	pH	4,50	4,90	4,90	5,00
	Col.	0	0	17	9
Allos jaune	pH	5,20	5,30	5,50	5,50
	Col.	0	1,5	23,5	6
Sable	pH	7,70	7,40	7,40	7,40
	Col.	0	0	0	0

Tableau a : Variations de pH et de coloration (= Col.) d'un milieu stérile, incolore et de pH neutre, après infiltration sur différents horizons.

pH : comme dans l'expérience précédente, la terre arable et les horizons d'accumulation d'humus et de fer acidifient fortement les eaux. Le sable, au contraire, ne provoque, pour ainsi dire, aucun changement.

coloration : les colorations sont nulles ou très faibles ; elles ne prennent d'importance qu'après manifestation d'une activité bactérienne naturelle.

Une deuxième expérimentation permettra de préciser le rôle qui revient aux liqueurs noires.

Les conditions d'expérience demeurent identiques seul le milieu utilisé est différent et comprend un mélange, à parties égales d'eau résiduaire et de milieu de Starkey (pH ajusté à 7,30 avec $SO_4 H_2$ N/10).

L'alimentation des colonnes en liquide s'effectue pendant cinq jours puis on interrompt pendant le même temps les additions et les prélèvements d'eaux pour reprendre ensuite avec des liqueurs fraîches pendant 14 jours.

Le tableau b consigne les résultats :

Apparition de l'activité bactérienne ▼

Horizons \ Jours		1	2	3	5	6	8	10	11	12	13	15	17	19
Milieu d'alimentation		pH 7,30 Coloration 10												
Terre arable	pH	4,20	4,40	4,50	4,65	4,80	4,80	4,85	5,05	6,10	6,80	6,90	7,00	8,10
	Col.	4	6,5	7	9	7	11	20,5	24,5	45,5	37	37	35,5	29
Allos noir	pH	4,90	5,00	5,10	5,20	5,30	5,30	5,30	5,20	5,40	5,50	5,90	6,10	6,50
	Col.	1	1	4	5	6	8	8	6	8	9	14,5	21	24
Allos jaune	pH	5,40	5,40	5,35	5,60	5,60	5,90	6,40	6,50	6,90	6,80	7,00	7,30	7,60
	Col.	2	8	8	9	10	16	18	18	28	18	20	21,5	22
Sable	pH	7,40	7,40	7,50	7,60	7,50	7,60	7,90	7,90	8,00	7,90	7,90	7,90	8,10
	Col.	5,5	5	9	9	13	14	10	12	13	12	10,5	13	15

Tableau b : Variations de pH et de coloration (= Col.) d'un mélange à parties égales d'eau résiduaire et de milieu de Starkey.

pH : les résultats confirment ceux de l'expérience précédente. Tous les horizons du sol, exception faite du sable, acidifient les liqueurs noires. Les pH remontent lentement, les eaux filtrant sur terre arable atteignent la neutralité en 17 jours, sur allos jaune en 15 jours. L'horizon d'accumulation d'humus possède un pouvoir tampon supérieur aux autres éléments du sol puisque les eaux présentent encore en fin d'expérience une réaction acide.

coloration : dans un premier temps, les eaux sont décolorées puis la surcoloration intervient dans tous les horizons après développement de la microflore du sol. Elle est maximum sur terre arable et moyenne sur alios jaune. Quant à l'alios noir et au sable, ils provoquent une plus faible accentuation à la teinte.

Une troisième expérimentation est destinée à établir l'influence du pH et des matières humiques sur les variations de coloration.

On remplit des colonnes de verre de 50 cm de longueur et de 40 mm de diamètre, à l'aide, d'une part, de terre arable humifère et, d'autre part, de la même terre dont on a éliminé toutes les matières humiques par solubilisation et extraction à l'aide d'une solution de soude à 4 % suivis de rinçage à l'acide nitrique et de nombreux lavages à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un sable pur.

L'ensemble des colonnes est alimenté par les liqueurs noires normales, c'est-à-dire de pH alcalin (9,50).

L'expérience dure 6 mois, les valeurs, exprimées en moyennes mensuelles, sont résumées dans le tableau suivant :

Horizon \ Durée	Origine	1 mois	2	3	4	5	6
Liqueurs noires pH	de 9,5 à 10,5						
Liqueurs noires Col.	2	2	4	9	4	6	7
Terre arable pH	5,55	4,40	4,50	4,70	5,00	4,90	5,10
Terre arable Col.	1	41	50	62	58	78	100
Sable pH	7,65	8,30	8,70	9,10	9,10	8,85	9,00
Sable Col.	1	1	4	5,5	7,5	9,5	14

Tableau c : Variations de pH et de coloration des liqueurs noires selon les différents horizons du sol.

En présence de sable pur, l'acidification est plus modérée : les eaux demeurent de réaction légèrement supérieure à la neutralité puis les pH

évoluent de 7,65 à 9. Les colorations restent très voisines de celle de l'eau résiduaire employée, cependant, on note en fin d'expérience une légère surcoloration.

On peut en conclure que l'abaissement de pH et la surcoloration se produisent, surtout, en présence de matières humiques.

Sur le terrain d'épandage, on peut admettre qu'à proximité du lieu de l'infiltration, les eaux résiduaires alcalines ont solubilisé les matières humiques contenues dans le sol. A la suite de ce lessivage, les eaux s'acidifient et se surcolorent. Ce phénomène cesse naturellement avec l'épuisement des réserves d'humus et a dû se produire tout au début de la pratique de l'épandage, c'est-à-dire en 1959 et peut-être en 1960. Ainsi peut-on interpréter la surcoloration passagère des eaux, sans sous-estimer le rôle des micro-organismes.

Ces faits trouvent leur confirmation dans les mesures de pH effectuées dans les puits les plus proches de l'épandage, c'est-à-dire aux puits 7 et 18 (situés respectivement à 20 m et 40 m).

Puits / Année	Puits 7 (20 m de l'épandage)		Puits 18 (40 m de l'épandage)	
	pH	Coloration	pH	Coloration
1959	6,30	13,5	6,30	22,5
1960	7,40	12	6,80	15
1961	7,95	7,5	7,50	11,5
1962	7,80		7,60	
1963	7,80	7	7,15	7
1964	6,80	10	6,70	6
1965	6,80	9	6,80	8

Tableau d : Variations de pH et de coloration (moyennes annuelles) aux puits 7 et 18, de 1959 à 1965.

On remarque qu'en 1959, les eaux ont un pH acide et sont fortement colorées surtout au puits 18.

A partir de 1960, les valeurs de pH augmentent régulièrement, de façon concomitante, les indices de coloration diminuent. Le lessivage des matières humiques semble alors terminé.

Jusqu'en 1963, les pH continuent à s'élever surtout au puits 7, le plus proche des canaux, où les valeurs approchent de 8. La baisse,en 1963, au puits 18 et la stabilisation au puits 7 sont dues vraisemblablement aux apports réduits d'effluents.

A partir de 1964, les valeurs de pH marquent une baisse très sensible allant de 0,5 unité au puits 18 et de une unité au puits 7. Cette diminution ne doit résulter que de la transformation des canaux en bassins d'infiltration.

3 - Influence du pH sur la coloration des eaux

Les composés ligneux, en solution dans les eaux résiduaires, se comportent de la même manière que les colloïdes électronégatifs du sol représentés par les substances humiques : tous deux sont dispersés en milieu alcalin et floculent en présence d'ions H^+. On peut donc supposer que l'intensité de la coloration des eaux dépend du pH, condition physico-chimique fondamentale du milieu. L'action acidifiante du sol sur les liqueurs noires épandues nous a conduit à étudier l'influence du pH sur la coloration des eaux.

A partir de liqueurs noires de pH 9,95 et de coloration 14 à la longueur d'onde de 8 500 Å, on réalise la gamme suivante de pH à l'aide d'acide sulfurique N/10.

9,60 - 8,20 - 7,45 - 7,00 - 6,55 - 5,50 - 4,20 - 3,25.

Après mise en équilibre de quelques heures, les échantillons sont centrifugés puis les indices de coloration mesurés à la longueur d'onde de 8 500 Å.

pH	9,95	9,60	8,20	7,45	7,00	6,55	5,50	4,20	3,25
Indice de Coloration	14	13,5	11,5	11	10	9,5	8	6,5	6

Tableau e : Variations de la coloration des eaux résiduaires en fonction du pH.

On constate, à la lecture du tableau, que l'intensité de la coloration diminue lorsque le pH s'abaisse.

Ce phénomène peut s'expliquer de la manière suivante : les composés ligneux solubilisés dans les solutions alcalines subissent au fur et

à mesure de l'acidification un début de floculation, cette dernière devenant totale à pH 1,90. L'examen des culots de centrifugation confirme cette interprétation. Traités par une base forte, ils prennent une coloration dont l'indice ajouté à celui de l'eau correspondante redonne la teinte d'origine.

Afin de savoir si les phénomènes observés au laboratoire se déroulent effectivement dans le sol, deux forages destinés à recueillir des prélèvements de terre sont creusés sur le terrain d'épandage : l'un situé entre les puits 3C et 7B, sur une partie du terrain soumise depuis longue date à l'action des eaux résiduaires (forage A), l'autre foré à 100 m au Sud du dispositif d'épandage, dans une région jamais atteinte par ces mêmes eaux (forage B, témoin).

Au moment du forage, on recueille toute la terre de la surface jusqu'à 0,50 m de profondeur, ensuite les prélèvements s'étagent tous les 50 cm jusqu'à la couche argileuse localisée à 7,50 m et à 10 m de profondeur, respectivement pour les forages A et B. Les échantillons sont séchés à l'étuve à 80°C jusqu'à dessication complète puis tamisés et homogénéisés. A partir de 50 g de terre, on extrait le mélange de composés humiques et ligneux par la soude à 4 % en renouvelant fréquemment le solvant jusqu'à obtention d'un liquide d'extraction incolore. Ce stade atteint et après mesure de leur volume total, les liquides d'extraction sont centrifugés puis les indices de coloration déterminés au spectrophotomètre à 5 500 Å de longueur d'onde. De façon à pouvoir comparer les différents prélèvements entre eux, ces indices expriment la teinte que l'on obtiendrait si un litre de solvant était nécessaire et suffisant pour solubiliser l'ensemble des composés humiques et ligneux contenus dans les 50 g de terre.

La coupe schématique du sol peut se traduire de la façon suivante. Jusqu'à 0,50 m de profondeur, la terre arable et le sable forment les horizons A_0, A_1 et A_2 puis font suite les zones d'accumulation d'humus et de fer ne dépassant pas 1 m de profondeur. L'horizon C constitué de sable s'étend jusqu'à la couche argileuse.

La figure 26 représente les variations de coloration des extraits, en fonction de la profondeur.

On remarque que jusqu'à 0,50 m de profondeur, le solvant se colore intensément et de façon sensiblement identique dans les deux cas considérés, par solubilisation des matières humiques en B ou ce qu'il en reste en A.

De 0,50 à 1 m, les différences s'accusent entre les deux types de forage. Les extraits du prélèvement témoin se surcolorent encore tandis que ceux obtenus avec le sol soumis à l'action des eaux résiduaires fournissent des indices de coloration nettement plus faibles, baisse, semble-t-il, attribuable au lessivage des horizons B_1 et B_2 par ces mêmes eaux.

De 1,50 à 3 m de profondeur, le sol témoin renferme peu de substances susceptibles de donner naissance à une coloration. Les valeurs, légèrement supérieures dans le sol soumis à l'influence des liqueurs noires, tendent à

montrer une certaine accumulation, au niveau du sable, de composés humo-ligniques à l'état floculé.

A partir de 3 m de profondeur et jusqu'à la couche argileuse, les liquides d'extraction, quelque soit leur origine, présentent des colorations très faibles et très voisines.

En résumé, les eaux résiduaires semblent provoquer le lessivage des horizons d'accumulation d'humus et de fer et s'acidifier à leurs contacts. L'abaissement de pH entraîne un début de floculation des matières organiques contenues dans le mélange eaux résiduaires et solutions du sol. Une partie des substances floculées a tendance à s'accumuler dans les couches de sable de 1 à 3 m. Il n'y a donc pas de danger d'accumulation importante.

B - MISE EN EVIDENCE D'UNE RELATION ENTRE LES DIFFERENTES CARACTERISTIQUES DES EAUX INFILTREES.

Il ne semble pas que l'on puisse établir une relation étroite entre le pH et les composants chimiques des eaux. Les eaux souterraines naturelles présentent une réaction acide avec un pH évoluant entre 5,50 et 6,00 et contiennent très peu de matières organiques, la demande chimique en oxygène s'élevant à 10 - 12 mg d'O_2/l.

Sous l'influence des liqueurs noires, on constate que les pH augmentent et atteignent la neutralité. Cette élévation s'accompagne d'un enrichissement en matières organiques apportées par les liqueurs noires (demande chimique en oxygène élevée). Cependant, il faut noter que, pendant la période de lessivage des matières humiques du sol, les eaux ont tendance à s'acidifier et leur teneur en matières organiques augmente fortement.

A partir de 1964, les variations de pH, de trop faible amplitude, ne permettent pas d'établir un rapport entre pH et oxydabilité. Les mêmes déductions peuvent être faites de l'étude des relations du pH et de la teneur en sodium ou en azote.

1 - Coloration, oxydabilité et azote

Les composés ligneux, sous forme d'alcali-lignines, confèrent aux eaux résiduaires leur coloration particulière et la majeure partie de leur demande chimique en oxygène : cette caractéristique physique doit logiquement être fonction de la concentration en éléments ligneux. Cependant, en s'infiltrant dans le sol, les eaux subissent de profondes modifications et il est intéressant de comparer les eaux résiduaires avant et après épandage.

Dans ce but, au laboratoire, nous avons mené en parallèle l'étude des composés ligneux isolés, d'une part, de liqueurs noires directement extraites du lessiveur (Kamyr) lors de la fabrication de la pâte, et, d'autre part, d'eaux résiduaires fortement colorées prélevées sur le terrain d'épandage au puits 3B à 180 m au Nord du lieu de l'infiltration.

Après obtention d'alcali-lignines, par précipitation sulfurique, lavage à l'eau et séchage, l'analyse comporte pour chaque échantillon les déterminations, en fonction de la concentration, de la coloration, de l'oxydabilité et de la teneur en azote total.

La réalisation des spectres d'absorption en lumière ultra-violette complète cette étude.

Le tableau suivant regroupe les résultats :

Concentration en mg/l	Coloration à 8 500 Å	Oxydabilité en mg d'O_2/l
500	4	954
1 000	8	1 911

Avant épandage

Concentration en mg/l	Coloration à 8 500 Å	Oxydabilité en mg d'O_2/l
500	13,5	858
1 000	27	1 643

Après épandage

Tableau f : Etude de la coloration et de l'oxydabilité en fonction de la concentration en alcali-lignines.

Dans les deux cas, coloration et oxydabilité varient proportionnellement à la concentration en composés ligneux. Cependant, pour des teneurs identiques en alcali-lignines, les colorations sont beaucoup plus élevées dans les solutions obtenues à partir des eaux du puits 3B tandis que la demande chimique en oxygène n'augmente pas mais au contraire diminue légèrement. Ainsi 100 mg de lignine extraite, avant et après épandage, demandent respectivement 191 et 167 mg d'oxygène par litre pour être chimiquement oxydés.

Ces nombres concordent avec ceux cités par WOODARD, SPROUL et ATKINS (244). Selon ces auteurs, à 100 mg de lignine correspond une oxydabilité de 170 mg d'O_2/l.

On ne peut donc pas interpréter l'augmentation de coloration en invoquant une concentration supérieure en matières organiques mais plutôt

comme la conséquence de transformations chimiques ou biochimiques dans le sol donnant naissance à des produits intermédiaires surcolorés par oxydation, par des processus d'échange avec les matières humiques ou avec les composés du fer présents dans le sol, par l'influence des micro-organismes.

Les spectres d'absorption en U.V. apparaissent très semblables (figure 27). Ils ont été obtenus par dissolution de la lignine dans une solution aqueuse d'ammoniaque avec élimination du solvant par évaporation. Le témoin de mesure, en l'occurence l'eau bidistillée, a subi le même traitement.

A la concentration de 5 mg/l, la lignine extraite du lessiveur présente un pic d'absorption maximum et très important à 2 100 Å et un autre de plus faible intensité à 2 860 Å. Après épandage, on ne note plus que la présence d'un seul pic à 2 100 Å.

Les dosages d'azote total traduisent encore mieux les différences entre ces deux catégories de lignine.

Les composés ligneux extraits des liqueurs noires renferment très peu d'azote, de l'ordre de 0,087 % (pourcentage exprimé par rapport au poids sec). Après épandage, la teneur s'élève fortement parvenant à 1,05 %. Cette augmentation peut s'interpréter par la solubilisation des matières humiques. L'expérience suivante le prouve.

On met en contact, aseptiquement, pendant un mois de la terre arable humifère prélevée sur le terrain d'épandage et de l'eau résiduaire préalablement stérilisées et l'on effectue, au début et à la fin de l'expérience, des dosages d'azote à partir de la terre et de l'eau. Les mesures de pH et de coloration complètent cette expérimentation.

	Au début de l'expérience		Après un contact de 1 mois	
	Terre humifère	Eau résiduaire	Terre humifère	Eau résiduaire
pH	3,75	10,25	5,90	5,70
Coloration à 8 500 Å	-	22	-	120
Teneur en azote	0,234 %	0,0024 ‰	0,125 %	0,037 ‰

Tableau g : Influence de la terre arable sur le pH, la coloration et la teneur en azote de l'eau résiduaire.

A la lecture du tableau g, on remarque qu'au contact de la terre arable, l'eau résiduaire,tout en s'acidifiant, se surcolore et s'enrichit en azote, inversement, la terre humifère se rapproche de la neutralité et s'appauvrit en azote.

a - Coloration et oxydabilité.

Sur la figure 28 sont représentées les courbes des variations de coloration et d'oxydabilité aux puits 1D, 3D et 3B, de 1963 à 1970.Ces puits ont été choisis à cause de leurs eaux présentant de grandes variations des caractéristiques étudiées.

On remarque, au puits 1D, une similitude parfaite entre les fluctuations de la coloration et de l'oxydabilité.

Au puits 3D, les variations sont dans l'ensemble parallèles,sauf de septembre 1963 à mars 1964 où elles s'inversent. Cette particularité peut s'interpréter par une augmentation de pH de 5,80 à 6,30. Nous avons déjà étudié l'influence du pH sur la coloration des liqueurs noires et avons noté que l'augmentation de pH provoquait une accentuation de la teinte.

Le même phénomène se produit au puits 3B de février à octobre 1964, période pendant laquelle les pH changent beaucoup.

Ces concordances entre l'évolution de la coloration et de l'oxydabilité, que l'on retrouve dans l'ensemble des prélèvements, prouvent que ces deux caractéristiques sont soumises à l'influence d'un facteur commun représenté par la teneur en composés ligneux et en substances humiques chimiquement voisines.

La relation entre oxydabilité et coloration ne prend de valeur que si l'on compare des eaux en voie d'épuration de pH très voisins. A pH égal, la demande chimique en oxygène est proportionnelle à la coloration.

b - Evolution du rapport oxydabilité/coloration.

Il est également intéressant de suivre l'évolution du rapport oxydabilité/coloration depuis la mise en service de la station d'épandage en 1959.

Ce rapport exprime la demande chimique en oxygène d'une eau ayant théoriquement un indice de coloration égal à l'unité. Ce calcul a été entrepris systématiquement pour l'ensemble des prélèvements effectués sur le terrain mais nous n'avons représenté dans le tableau suivant que les valeurs intéressant les puits situés dans la direction préférentielle d'écoulement des eaux vers l'Eyre,c'est-à-dire,les puits 18, 21, 3B, 5C, 5D, 1D, 1E et 2E.

Puits / Année	18	21	3B	5C	5D	1D	1E	2E
Distance de l'épandage (en m)	40	100	180	260	340	340	420	420
1961	60							
1963	59	53	62	46,5	32	34		
1964	47	42	59	54	29,5	39	36	36
1965	48,5	40	58,5	32,5	21,5	40	38	31
1967	42	44	34	24		30		20
1970	35		41,5		36,5	41		18

Tableau h : Variations du rapport oxydabilité/coloration

On remarque, dans de nombreux puits (18, 21, 3B, 5C, 2E), une diminution régulière des valeurs du rapport de 1961 à 1970. Ainsi au puits 18, en 1961, des eaux d'indice 1 de coloration auraient eu une demande chimique en oxygène de 60 mg alors qu'en 1970 cette dernière n'est plus que de 35 mg pour des eaux de même couleur. En d'autres termes, à coloration égale, les eaux perdent de leur oxydabilité et, inversement, à oxydabilité identique, elles se surcolorent d'année en année. On peut aussi envisager l'évolution du rapport oxydabilité/coloration non plus en fonction du temps mais de la distance qui sépare les puits étudiés du lieu de l'infiltration.

De 1963 à 1965, les plus fortes valeurs se rencontrent jusqu'à 180 m de l'épandage avec un maximum au puits 3B puis diminuent brusquement au puits 5C (260 m de l'épandage). Les valeurs les plus faibles sont atteintes au puits 5D (340 m); on assiste ensuite à une légère remontée dans les puits les plus éloignés.

En 1967, les modifications demeurent sensiblement identiques, les résultats les plus élevés se situent aux puits 18 et 21. Les valeurs décroissent régulièrement ensuite, exception faite du puits 1D.

Enfin en 1970, les résultats sont nettement plus homogènes (variations de 35 à 41), sauf au puits 2E (rapport de 18).

La valeur absolue du rapport oxydabilité/coloration semble donc diminuer avec le temps et dans l'espace. Pour tenter d'interpréter ce phénomène, on peut penser à la mise en oeuvre d'une épuration biologique faisant intervenir des micro-organismes de mieux en mieux adaptés à la dégradation des eaux résiduaires. Selon JACQUIN (125) et FLAIG (83), la lignine peut être fragmentée en présence d'une microflore adaptée. Les phénols simples libérés peuvent ou bien être métabolisés ou bien se condenser sous l'influence d'oxydases microbiennes en donnant des produits colorés azotés analogues aux acides humiques. L'oxydation des phénols est catalysée par des ions métalliques (Fe^{+++}). De nombreux micro-organismes sont capables de provoquer des réactions de brunissement conduisant à la production de substances parahumiques à partir de divers composés aromatiques comme le signalent SUNDMAN et HARO (219), HARDISSON et POCHON (109). Ces réactions sont d'ailleurs très mal connues et constituent un des domaines les plus complexes de la chimie organique.

Nous avons constaté que de 1961 à 1970, pour des eaux de même coloration, les valeurs d'oxydabilité diminuaient. Il y a donc eu dégradation des matières organiques contenues dans les eaux résiduaires avec vraisemblablement formation de produits intermédiaires donnant une coloration à l'état oxydé. Ces conclusions rejoignent celles que nous avions formulé lors de l'étude des composés ligneux avant et après épandage.

c - Coloration et azote

L'examen des courbes de la figure 29, complété par l'étude des puits 3B, 3C et 5C, montre que les liqueurs noires en s'infiltrant dans le sol s'enrichissent en azote et sont surcolorées.

On remarque, dans l'ensemble, que les variations de la teneur en azote paraissent évoluer de la même manière que celles de la coloration ou de l'oxydabilité, ces deux caractéristiques étant liées.

L'augmentation du taux d'azote ne dure pas mais chaque puits présente des variations analogues à des époques différentes.

On peut donc en conclure que le lessivage de l'humus entraîne une élévation de la teneur en azote.

2 - Coloration et teneur en sodium

On s'aperçoit, lorsque l'on compare les résultats, qu'il n'y a aucune relation apparente entre les variations de coloration et les concentrations en sodium.

Les plus fortes colorations relevées, par exemple au puits 3D, au

mois de mars 1964, avec un indice de 27,5 correspondent à une concentration de 0,164 g/l de sodium, alors qu'au même puits, des eaux de 16 de couleur,de pH très voisin, ont une teneur en sodium de 0,188 g/l (novembre 1965). Au puits 7B, au mois de mai 1965, une coloration de 4 équivaut à 0,206 g/l de sodium et une coloration de 8 à 0,158 g/l au mois de novembre de la même année.

C - RESUME DES RESULTATS

La texture et la structure du sol confèrent au terrain d'épandage une grande perméabilité se traduisant par une infiltration facile des liqueurs noires, une filtration rapide par gravité et leur élimination par drainage naturel.

Les interactions sol-effluent semblent se dérouler en trois phases d'inégales durées.

En premier lieu, au cours de la filtration et sous l'effet de l'humectation, apparaît le gonflement ou l'imbibition des colloïdes présents dans les horizons d'accumulation d'humus et de fer.

Cette phase se concrétise par un léger abaissement de pH mais surtout par une décoloration très marquée des liqueurs noires, faits constatés expérimentalement pendant la première semaine d'épandage sur colonne au laboratoire. A la sortie du dispositif, les eaux, de pH 7,80, ont un indice de coloration de 1 tandis que l'effluent, de pH 10 à 11, a une couleur de 12. Ces observations sont confirmées par l'expérience de lessivage de la terre arable humifère à l'aide d'eaux résiduaires.

On peut donc supposer que le même phénomène est intervenu sur le terrain au cours du premier mois qui a suivi la mise en service de l'épandage.

L'imbibition des colloïdes est de faible durée. Pendant la seconde phase, les liqueurs noires riches en sulfate de sodium, donc en ions Na^+ vont être le siège d'échanges chimiques avec le complexe absorbant acide.

Le complexe H^+ fixe un ion Na^+ et libère un ion H^+ qui augmente l'acidité. Cette acidité d'échange neutralise les liqueurs noires et tend à limiter la réaction à un état d'équilibre. D'autre part, il est bien établi que les bases ne provoquent pas le déplacement des cations métalliques fixés sur le complexe mais seulement celui des ions H^+ et il existe une réaction stricte d'équivalence entre les ions échangés (GAUCHER) (92). L'ensemble de ces échanges aboutit à la formation d'un complexe sodique à l'état dispersé qui migre suivant la pente naturelle du sol. Ce complexe renferme des substances très fortement oxydables et colorées, à teneur élevée en azote. La concentration en sodium, provenant presque exclusivement de l'effluent, ne subit pas de grandes modifications.

Cette seconde phase, de durée beaucoup plus grande que la première, s'observe nettement dans les expérimentations analytiques des horizons du sol (terre arable, "alios noir et jaune") et dans le dispositif d'infiltration sur colonne déjà décrits. Sur le terrain d'épandage, elle se produit de 1959 à 1963 et l'on constate que les liquides prélevés, suivant le sens préférentiel d'écoulement des eaux (direction Sud-Ouest-Nord-Est) ont une coloration, une oxydabilité et une teneur en azote en hausse.

La troisième phase débute au moment où les processus d'échanges perdent de leur intensité : les matières humiques représentant le complexe absorbant semblent s'épuiser. On remarque alors que les eaux ayant filtré dans le sol se décolorent, perdent de leur pouvoir réducteur et s'appauvrissent en azote, le taux de sodium étant sensiblement le même. Dans l'ensemble, les valeurs sont inférieures à celles de l'effluent. Une épuration s'est implantée comme le montre l'évolution du rapport oxydabilité/coloration,sa présence est rendue plus perceptible par suite de l'atténuation du lessivage de l'humus. L'activité des micro-organismes peut modifier l'équilibre du sol : acidification par production d'acides organiques et libération d'ions H^+ au cours de la dégradation des matières organiques, alcalinisation par sulfatoréduction à partir des sels minéraux entraînant des variations de coloration.

Chapitre III

MICROBIOLOGIE DES EAUX

L'infiltration des eaux résiduaires dans le sol apparaît être une technique favorable à la mise en oeuvre d'une épuration biologique puisque, contrairement à ce que l'on pouvait logiquement supposer, le pH élevé des liqueurs noires ne constitue pas un obstacle au développement des micro-organismes. Le sol des Landes, au pH acide, neutralise de façon naturelle ces liqueurs. A la lumière des résultats des analyses physico-chimiques, on peut soupçonner l'existence de phénomènes biologiques d'épuration dont seules les études quantitative et qualitative de la microflore permettront d'en connaître l'importance et l'efficacité.

A - ETUDE QUANTITATIVE

De même que la fertilité d'une terre paraît liée à l'importance numérique des germes qu'elle renferme, la qualité de l'épuration biologique est fonction de l'activité microbiologique régnant dans les eaux usées à purifier. L'estimation de la population microbienne,encore appelée microflore totale, et l'étude de ses variations,sur des prélèvements d'eau réalisés en de nombreux points du terrain d'épandage,constituent le complément indispensable des analyses physico-chimiques dont les résultats reflètent les fluctuations du métabolisme bactérien.

A cet examen de la microflore totale vient s'ajouter le dénombrement des bactéries sulfato-réductrices, spécifiques des eaux contenant des produits soufrés, dont le rôle épurateur éventuel ne peut être négligé.

1 - Microflore totale

Les résultats sont consignés dans le tableau n° 14 et traduits en courbes dans les figures 30 à 33.

Au puits 18, de novembre 1959 à février 1960, la microflore totale des eaux prélevées prolifère fortement de 24 000 à 325 millions de germes par ml (figure 30). Des pluies intenses (550 mm), surtout pendant le

dernier trimestre de 1959, et un déversement élevé de liqueurs noires (près de 400 000 m3) caractérisent cette période.

De mars à juillet 1960, la population microbienne baisse considérablement de 140 à 7,5 millions. Cependant, si les volumes d'effluents demeurent importants, la pluviosité diminue. On note d'ailleurs, au mois de mai, une recrudescence du développement bactérien coïncidant avec une période très pluvieuse.

D'août à décembre 1960, pendant la suspension de l'épandage, le nombre de micro-organismes s'amoindrit, sans doute, par épuisement de matières nutritives et se situe aux alentours de 700 000 germes/ml, se relève légèrement en décembre à la suite du lessivage du sol par les pluies très abondantes de l'automne.

A partir de janvier 1961, avec la reprise d'un épandage modéré, rendu possible par un état de sécheresse relative, la population microbienne s'accroît de nouveau, atteint 8 700 000 germes/ml puis diminue en présentant des fluctuations d'interprétation difficile. Pendant le second semestre de l'année 1961, la perméabilité correcte du sol se prête à un apport accru d'eaux résiduaires (250 000 m3), il s'ensuit un regain d'activité des micro-organismes.

Deux facteurs d'origine externe, le débit d'eaux résiduaires et la pluviosité, semblent avoir une action prépondérante sur le développement de la microflore, le premier par l'apport de substances nutritives, le second réalisant une dilution optimum. Un équilibre entre ces deux facteurs permet d'entretenir une activité élevée de la multiplication microbienne.

Ainsi, en 1962, le rejet d'un très grand volume d'eaux résiduaires (plus de 500 000 m3) favorisé par une pluviosité faible, entrave l'activité microbienne qui diminue pendant toute l'année de 12 millions à 50 000 germes/ml, exceptions faites des prélèvements du mois d'avril. L'année suivante, nettement plus humide (968 mm au lieu de 764 mm en 1962), la microflore totale continue à décroître : la moyenne des numérations atteint 170 000 germes (maximum de 600 000 en avril). Cette baisse peut s'interpréter par la réduction notable d'effluents déversés.

En 1964, la population microbienne, sous l'influence de facteurs externes pratiquement semblables à ceux de l'année 1962, s'accroît légèrement. Les résultats des numérations varient de 4 millions en février à 100 000 en septembre. La raréfaction des pluies (705 mm) limite sans doute le développement des germes.

En 1965, avec un déversement moyen d'effluents et une hauteur d'eau très supérieure à la normale (1 189 mm), la microflore totale s'élève fortement, notamment de janvier à mars, oscillant entre 20 et 50 millions de germes/ml. Les valeurs,plus faibles, enregistrées en septembre (250 000)peuvent être considérées comme la conséquence du rejet d'effluents concentrés.

L'analyse des prélèvements de 1967 à 1970 met en évidence une activité microbienne importante.

Une dilution assez prononcée de l'effluent entraîne donc la multiplication des micro-organismes. Celle-ci subit un ralentissement au moment où cessent les pluies et lorsque les substances nutritives, en solution dans les eaux résiduaires, semblent s'épuiser. Les corrélations entre les variations de la pluviosité, du débit de l'effluent et de la microflore totale n'apparaissent pas immédiatement mais après un délai minimum de un mois.

Une comparaison avec l'évolution de la température ambiante permet de nier toute action possible de ce facteur. En effet, au cours des périodes froides, de janvier et février, les micro-organismes se développent de façon notable alors que de mai à juillet, en atmosphère particulièrement chaude, le nombre de germes tend nettement à baisser. Les variations thermiques, journalières et saisonnières,doivent s'amortir à la profondeur des prélèvements.

Les numérations effectuées dans les eaux des puits 18, 18 bis et 18 ter montrent que l'activité microbienne s'accentue avec la profondeur (figure 31). Ce phénomène, très nettement visible de 1959 à 1960, s'estompe et disparaît ensuite, les eaux s'homogénéisant. Cette particularité rejoint les remarques concernant l'acidification et la surcoloration des eaux faites lors de l'étude des caractéristiques physiques.

Au puits 7 (figure 30), l'évolution de la microflore ressemble à celle du puits 18 jusqu'à la fin de l'année 1960. De mai 1961 à avril 1962, la population bactérienne s'appauvrit, son importance varie de 70 000 à 600 000 germes/ml. L'influence de la faible dilution de l'effluent par les eaux de pluie se perçoit mieux à ce puits situé seulement à 20 m de l'épandage qu'au puits précédent.

En 1963, de mars à mai, le développement microbien s'intensifie (17,5 millions de germes/ml) puis diminue régulièrement au cours de l'année parvenant à 300 000 germes en novembre.

De 1964 à 1965, une recrudescence de l'activité microbienne élève la microflore à 14-17 millions. Enfin, les derniers résultats de 1968 et 1970 se rapprochent de ceux notés au puits 18.

Au puits 21, la densité de la population microbienne, comparée à celle du puits 18, s'abaisse mais les variations demeurent parallèles. Cette tendance à l'appauvrissement se confirme aux puits 7B, 7D et 7E. De 1962 à 1965, les résultats des numérations oscillent entre 2 000 et 34 000 germes/ml. En 1967, coïncidant avec un enrichissement des eaux en matières oxydables (1 100 mg d'O_2/l), la microflore augmente fortement et atteint 400 000 germes/ml au puits 7B. De 1968 à 1970, elle se stabilise à 100 000 germes/ml aux trois lieux de prélèvements considérés.

Enfin, à l'extrémité de la ligne des puits 7, les eaux du puits FF

acides et à très faible demande chimique en oxygène, ne renferment que très peu de micro-organismes (de 450 à 1 450 par ml).

Lorsque l'on s'éloigne du lieu de l'infiltration, l'activité microbienne régresse. Elevée jusqu'à 180 m de distance, la microflore baisse ensuite brutalement.

A l'Ouest, le long du ruisseau, les puits F3 et F5 renferment des eaux dont la microflore élevée en 1963 (1 à 2 millions de germes/ml)diminue ensuite respectivement à 95 000 et à 36 000 en 1970 (tableau n° 14).

Le puits F4, situé entre les deux précédents, s'en distingue par une microflore quantitativement voisine de celle des eaux naturelles.

A l'Est, suivant la ligne des puits 3, l'évolution générale de la microflore se confirme, c'est-à-dire une baisse au-delà de 180 m de distance de l'épandage (figure 32). La population microbienne, assez homogène, ne varie plus qu'entre 10 000 et 100 000 germes/ml sauf au 3C où les valeurs faiblissent nettement.

Suivant la ligne des puits 5, les eaux du 5C et du 5D se comportent de façon identique à celles du 3B (figure 33) et du 3C.

L'ensemble des puits localisés à l'extrémité Est du terrain renferme une microflore très peu abondante.

Au puits 1D, les résultats des numérations oscillent entre 2 000 et 12 000 germes/ml. Le nombre de micro-organismes baisse encore aux puits 2D, F6, 1 à 4E, et tend vers les caractéristiques de l'eau naturelle.

Aux puits F7 et F8, plus proches de l'épandage, la population bactérienne s'accroît surtout en 1963 et 1965.

En résumé, en partant du lieu de l'infiltration et en se dirigeant du Sud vers le Nord, les puits 7 et 18 présentent, du point de vue microbiologique, une activité élevée sensiblement égale. Celle-ci s'affaiblit légèrement au puits 21 et de façon plus marquée aux puits 7B, 7D et 7E.

Dans les directions 3 et 5, le développement de la microflore, maximum aux puits 3B et 5C, diminue ensuite.

A l'Est du terrain, aux prélèvements 1D, F7 et F8, l'activité microbienne demeure encore relativement importante. Il semble donc que les valeurs les plus fortes s'étalent, à partir du puits 18, suivant une ligne orientée Sud-Ouest/Nord-Est et matérialisée par les puits 21, 3B, 5C et 1D, ligne qui représente le sens préférentiel d'écoulement des liqueurs noires en direction de l'Eyre. On peut déceler un second sens de cheminement des eaux moins important que le précédent joignant approximativement le puits 18 au puits F3

et affectant le 9C. Ce cheminement ne paraît être utilisé que lorsque l'évacuation des eaux vers l'Est devient impossible.

2 - Microflore sulfato-réductrice

La mise en évidence dans l'Eyre, par CAZAUX et SECHET (56), de germes réducteurs, appartenant au genre *Desulfovibrio* et participant au cycle du soufre, a orienté nos recherches vers le dénombrement de ces bactéries dans les eaux infiltrées. De plus, l'odeur prononcée d'hydrogène sulfuré, constatée lors des prélèvements, autorisait à soupçonner l'existence de fermentations anaérobies au sein du sol pouvant s'expliquer par la teneur élevée en sulfates des eaux résiduaires déversées.

Les germes sulfato-réducteurs existent à l'état naturel dans la majorité des terres. Le sol du terrain d'épandage en renferme en quantité très faible, environ de 18 à 20 germes par gramme.

Les résultats, groupés dans le tableau n° 15, prouvent une activité sulfato-réductrice surtout aux puits 7, 11, 18 et 21, c'est-à-dire à proximité de l'épandage. L'étude détaillée de ces trois premiers puits, pendant l'année 1961, résumée dans le tableau suivant permet de faire des remarques intéressantes :

Les variations globales dans ces différents puits paraissent similaires. On constate une augmentation du nombre de germes à la fin de l'hiver, augmentation plus accusée au mois de mars pour le puits 11 et au mois d'avril pour le puits 18, à la fois moins superficiel et plus éloigné.

Puits / Mois	7 (20 m)	11 (20 m)	18 (40 m)
Janvier	100	200	190
Février	200	250	285
Mars	200	600	650
Avril	250	110	4 400
Mai	45	75	75
Juin	18	470	1 400
Juillet	70	35	850

Variations du nombre de germes sulfato-réducteurs dans les eaux des puits 7,11 et 18, au cours de l'année 1961

Un ralentissement général de la prolifération des germes caractérise la période printanière. A partir du mois de juin, on assiste, sauf au puits 7, à une recrudescence marquée du développement de ces micro-organismes.

Les variations synchrones démontrent l'action de facteurs communs, facteurs d'origine externe susceptibles d'agir sur le développement bactérien.

Le maximum d'activité des bactéries sulfato-réductrices observé au début du printemps correspond assez exactement avec la période sèche des mois de février à avril. Il semble donc qu'à l'inverse du développement de la microflore totale, les chutes de pluie n'exercent pas un effet favorable,ceci peut-être pour deux raisons : en diluant les eaux résiduaires et en leur apportant de l'oxygène, néfaste au développement des bactéries sulfato-réductrices.

Au cours des mois d'avril et de mai, les précipitations reprenant, l'activité bactérienne se trouve nettement réduite. Cependant, au cours de la période estivale, l'accroissement du nombre de germes correspond à une époque assez anormalement pluvieuse. Il semble qu'un apport croissant d'eaux résiduaires, à partir du mois de mai, compense l'abondance de la pluviosité.

On remarque, également, que les germes sulfato-réducteurs diminuent dans l'ensemble des puits situés en bordure de l'épandage de 1961 à 1963. Cette baisse peut s'expliquer par le faible rejet d'eaux résiduaires et aussi par une pluviosité assez élevée. A partir du second semestre de 1964, à la fin des travaux d'aménagement en bassins, l'épandage reprend avec un déversement considérable d'eaux résiduaires, on note alors un accroissement du développement bactérien qui se poursuit l'année suivante. Les dénombrements demeurent cependant inférieurs à ceux relevés en 1961 ; le développement des micro-organismes a sans doute été entravé par une pluviosité largement supérieure à la normale (1 189 mm, la moyenne habituelle avoisinant 1 000 mm).

En considérant l'ensemble des résultats des autres puits (tableau n° 15), on constate que la population de bactéries sulfato-réductrices est très réduite exceptée aux puits 7B, 3B, 5C et 9C.

La microflore sulfato-réductrice semble peu active ; l'intérêt de son étude s'en trouve amoindri. Une recrudescence du développement se manifeste à proximité de l'épandage vraisemblablement pour les mêmes raisons que celles exposées lors de l'étude de la microflore totale.

La concentration en eaux résiduaires favorise la prolifération des germes sulfato-réducteurs, la pluviosité ayant une influence contraire.

Lorsque l'on s'éloigne de l'épandage, les valeurs maxima se situent aux puits 3B et 5C suivant une direction Sud-Est et également au puits 9C. Ces conclusions rejoignent celles de la microflore totale.

3 - Résumé des résultats

On peut admettre, qu'à proximité de l'épandage, les micro-organismes métabolisent les substances nutritives facilement biodégradables des eaux résiduaires, c'est-à-dire celles qui donnent une forte D.B.O. La demande chimique en oxygène diminue par élimination de la D.B.O. L'intensité de la prolifération dépend, alors, du débit de l'effluent et du régime des pluies.

Ce développement microbien à proximité du lieu de l'épandage permet d'expliquer le colmatage du dispositif expérimental d'infiltration et celui observé sur le terrain en 1960. La perte totale de perméabilité doit provenir de l'obstruction des interstices du sol par des amas de micro-organismes morts ou par leurs produits de métabolisme (sécrétions muqueuses). Les processus biologiques étant accélérés par la température, le colmatage, dans les conditions du laboratoire, s'est produit très rapidement, après deux mois d'utilisation. Ce phénomène, constaté expérimentalement, s'est déroulé en 1960 sur le terrain d'épandage. A la fin du printemps, lorsqu'on voulut,pour des raisons pratiques, faire infiltrer des quantités importantes d'eaux dans le terrain, on remarqua un ralentissement de l'absorption qui devait devenir nulle à la fin du mois de juillet. Un arrêt de quelques mois devait permettre la régénération de la perméabilité, favorisée par des pluies intenses.

Une étude américaine du National Council for Stream Improvement rapportée par BLOSSER et OWENS (19) montre l'influence de la charge en D.B.O. des eaux épandues sur la qualité de l'infiltration. Selon ces auteurs, une charge de D.B.O. de l'ordre de 350 kg/ha/jour, appliquée de façon continue pendant quelques mois, provoque une réduction de l'infiltration. Les conditions optima d'épandage correspondent à des charges limites de 250 kg/ha/jour. Si l'on compare ces données avec celles relevées à la station d'épandage et résumées dans le tableau suivant, le colmatage s'explique par une trop forte concentration en substances biodégradables provoquant une prolifération intense de micro-organismes et dont la conséquence est la perte de perméabilité.

	janv.	févr.	mars	avr.	mai	juin	juil.	août	sept.	oct.	nov.	déc.
1959	-	-	-	-	-	-	-	370	580	905	421	257
1960	278	255	383	553	560	320	151	0	0	0	0	60
1961	20	65	114	179	169	213	317	325	373	88	22	20

Charge approximative de D.B.O., en kg/ha/jour, apportée à la station d'épuration de 1959 à 1961.

Ensuite, les liqueurs noires privées de leurs éléments nutritifs directement assimilables s'avèrent beaucoup plus difficiles à dégrader, les matières organiques se présentant principalement sous forme de lignines fortement biorésistantes. Cet état de fait entraîne un abaissement brutal du nombre de micro-organismes. On peut également envisager le développement d'une microflore nouvellement adaptée à l'épuration de ce milieu. L'évolution du rapport oxydabilité/coloration semble le confirmer.

Dans une dernière phase réalisée à l'Est du terrain, les eaux résiduaires fortement décolorées, appauvries en matières organiques, ne permettent plus le développement de micro-organismes qui atteignent des valeurs voisines de celles des eaux naturelles.

B - ETUDE QUALITATIVE : IDENTIFICATION DES SOUCHES

De nombreux prélèvements en vue d'isolement et d'identification de micro-organismes ont été effectués dans les puits à différentes distances du lieu d'infiltration, de manière à obtenir une représentation aussi fidèle que possible de la diversité d'espèces composant la microflore totale des eaux en différents endroits du terrain.

Ces prélèvements ne peuvent être simultanés : l'avancée de la nappe souterraine d'eaux résiduaires, en voie d'épuration, implique l'analyse de nouveaux échantillons. Cependant, des examens à différentes périodes permettent de combler cette lacune et de mettre, éventuellement, en évidence une évolution de la microflore.

La méthode d'isolement employée repose sur la pratique classique des suspensions-dilutions en eau stérile avec ensemencement sur milieu gélosé en boite de Pétri. On considèrera donc, comme éléments dominants de la microflore, les germes développés aux dilutions les plus fortes, sans pour autant négliger l'identification des micro-organismes apparus aux dilutions inférieures et, malgré tout, susceptibles de jouer un rôle dans les phénomènes d'épuration.

Une fois purifiée, chaque souche est répertoriée suivant un symbole indiquant le lieu de prélèvement par le numéro du puits, les souches différentes étant distinguées par une lettre minuscule qui suit, enfin les deux derniers chiffres rappellent l'année de l'isolement : ex. 21 a63, 7B b63.

L'exposé de cette étude qualitative sera divisée en deux parties : la première partie traitera de la détermination des espèces, la seconde sera consacrée à leurs répartitions géographiques, à leur évolution dans le temps et aux relations existant entre les micro-organismes et leur milieu d'origine, c'est-à-dire à leur écologie.

Les 66 souches isolées, en culture pure, se composent de bactéries et de champignons.

1. Bactéries

Elles peuvent être réparties, suivant leurs aspects macroscopique et microscopique, en quatre catégories :

a) Bactéries à Gram négatif, mobiles
b) Bactéries à Gram négatif, immobiles
c) Bactéries à Gram positif, mobiles
d) Bactéries à Gram positif, immobiles

Pour chaque groupe, nous avons pratiqué l'examen des caractères morphologiques et biochimiques considérés usuellement comme majeurs pour la détermination du genre et de l'espèce. Seuls, les caractères biochimiques seront résumés sous forme de tableaux.

a) Bactéries à Gram négatif, mobiles

La production ou non de pigments vert-fluorescent, solubles dans l'eau ou insolubles, et le mode d'assimilation des glucides constituent autant de critères qui permettent de grouper les 17 souches de bactéries à Gram négatif mobiles en quatre sections (tableaux a et b).

Les 9 souches suivantes : 18 a63, 18 a64, 18 a65, 18 b67, 21 a63, 7D a63, 2D a64, 5C a64 et 1E a64 fermentent le glucose et le saccharose avec production abondante de gaz, le lactose sans dégagement de gaz. Elles donnent toutes une réponse positive au test de Voges-Proskauer et font virer,au jaune, le rouge de méthyle. Les citrates peuvent constituer l'unique source de carbone. La gélatinolyse et la réduction des nitrates sont très actives.

L'ensemble de ces caractères conduit à placer ces 9 souches dans la famille des *Enterobacteriaceae* et à les rattacher aux genres *Paracolobactrum* et *Aeromonas*, ces derniers se différencient notamment par leur mode de ciliature.

Les souches 2D a64 et 5C a64, activement mobiles par cils péritriches, se développent sous forme de colonies blanc-jaunâtres, lisses, brillantes et surélevées. En milieu liquide, le bouillon est troublé avec fine pellicule et dépôt abondant. Par leur production d'acétoïne et l'absence de fermentation du lactose avec gaz, elles se rapprochent de l'espèce *Paracolobactrum aerogenoides* Borman et *al* 1944 et s'en éloignent par la liquéfaction de la gélatine.

Les sept autres souches, morphologiquement et biochimiquement semblables, possèdent une ciliature polaire et appartiennent à l'espèce *Aeromonas liquefaciens* Kluyver et Van Niel 1936, curieusement placée, en raison de la disposition de ses flagelles, dans la famille des *Pseudomonadaceae* par le Bergey's Manual (14), alors, que l'ensemble des autres caractères la situe plus logiquement dans celle des *Enterobacteriaceae*.

Caractères \ Souches	18 a63	18 a64	18 a65	18 b64	18 b67	18 e63	21 a63	21 b63	5C c64	7D a63	1E a64	2E a64
Dilution d'isolement	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}
Température optimum	28-37	28-37	28-37	20	28-37	25-28	28-37	20-28	28-37	28-37	28	28
Glucose	+ G	+ G	+ G	−	+ G	+	+ G	+	−	+ G	+ G	±
Maltose	+ G	+ G	+ G	−	+	−	+ G	−	−	+ G	+	−
Saccharose	+ G	+ G	+ G	−	+ G	−	+ G	−	−	+ G	+ G	−
Lactose	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−
Mannitol	+	+	+	+	+		+		−	+	+	−
Amidon	+	+	+	±	+	+	+	−	+	+	+	−
Lait	+ A p	+ A p	+ A p	−	+ A	−	+ A p	− alc	+p	+A p	+ A	−
Gélatine	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−
Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+
Citrates (SIMMONS)	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Indole	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	−	−
Hydrogène sulfuré	+	+	+	−	−	−	+	−	−	+	+	−
Rouge de Méthyle	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Acétoïne	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−

Tableau a : Bactéries à Gram négatif, mobiles par cils polaires

A = lait acidifié
G = dégagement de gaz
p = peptonisation

Les colonies sont blanchâtres, circulaires, lisses et brillantes. En milieu liquide, le développement se compare à celui de *P. aerogenoïdes*.

La souche 18 b67, ne produisant pas d'hydrogène sulfuré à partir de peptones, peut être considérée comme une variété d'*A. liquefaciens*.

La souche 1E a64 élaborant, en milieux liquide et solide, un pigment brun soluble, particularité signalée pour l'espèce : *A. salmonicida*, se situe entre les espèces *A. liquefaciens* et *A. salmonicida* (Lehmann et Neumann 1896), Griffin 1954.

Les trois souches 2E a64, 18 b64 et 21 b63, mobiles par cils polaires, dégradent les glucides uniquement par voie oxydative et produisent des pigments vert-fluorescent solubles dans le milieu de culture. Elles font incontestablement partie de la famille des *Pseudomonadaceae* et se rattachent au genre *Pseudomonas*.

L'absence quasi-totale d'utilisation des sucres (seul le glucose subit une très lente attaque), la non-liquéfaction de la gélatine permettent d'identifier la souche 2E a64 à l'espèce *Pseudomonas putida* (Trévisan 1889), Migula 1895.

La souche 21 b63, très voisine de *Ps. putida* s'en distingue par la protéolyse en cylindre avec dépôt rosé et l'absence de réduction des nitrates. L'ensemble des autres caractères la fait appartenir à *Pseudomonas geniculata* (Whrigt 1895), Chester 1901.

La dernière souche du genre *Pseudomonas*, 18 b64, s'apparente à *Ps. oleovorans* Lee et Chandler, 1941. Les colonies rondes, régulières, brillantes, de couleur crème, présentent une fluorescence légère, nettement moins accentuée que celle produite par *Ps. putida*. En gélose profonde, se développent des colonies lenticulaires, caractéristiques de l'espèce *oleovorans*.

L'espèce classiquement décrite fut isolée d'un sol imprégné d'huile minérale, à cette seule restriction, 18 b64 est identique à *Ps. oleovorans*.

La présence de pigment orangé, insoluble dans l'eau, conduit à situer la souche 18 j65, mobiles par cils péritriches, dans la tribu des *Chromobactereae* du genre *Flavobacterium* Brisou 1957 mais elle ne correspond à aucune espèce décrite.

Les souches 3D d65, 5C c64, 18 e63, 3E a65, non pigmentées, mobiles par cils péritriches ou polaires, ne produisant pas de gaz lors de la dégradation des glucides, peuvent être groupées dans la tribu des *Achromobactereae* du genre *Achromobacter*.

Mobile par cils péritriches, liquéfiant la gélatine, ne modifiant pas le lait tournesolé et réduisant les nitrates, la souche 3D d65 est très voisine d'*Achromobacter iophagus*, elle ne s'en distingue que par l'absence d'amylolyse, caractère très secondaire.

Caractères \ Souches	18 J65	2D a64	3D d65	5C a64	3E a65
Dilution d'isolement	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}
Température optimum	28-37	20-37	28-37	20-37	28
Glucose	+	+ G	+	+ G	+
Maltose	-	+ G	±	+	+
Saccharose	+	+ G	+	+ G	+
Lactose	-	+	-	+	+
Mannitol	+	+	-	+	+
Amidon	-	+	-	+	-
Lait	+ A	+ A	-	+ A	-
Gélatine	+	±	+	+	+
Réduction des nitrates	+	+	+	+	-
Citrates (SIMMONS)	-	+		+	+
Indole	-	-	-	-	-
Hydrogène sulfuré	-	+	-	+	-
Rouge de méthyle	-	-	-	-	-
Acétoïne	-	+	±	+	+

Tableau b : Bactéries à Gram négatif, mobiles par cils péritriches.

A = lait acidifié
G = dégagement de gaz

Quant aux souches 5C c64, 18 e63 et 3E a65, leurs caractères ne permettent pas de leur attribuer un nom spécifique. Seule 5C c64 est intermédiaire entre *A. delicatus* (Jordan 1890), Bergey 1923 et *A. cycloclastes* (Gray et Thronton), Bergey 1930.

b) Bactéries à Gram négatif, immobiles

Cinq souches sont isolées : 18 a67, 5C d64, 18 f65, 7B b67, 3D f65; nous ferons momentanément abstraction de la souche 3D f65 dont la position taxonomique s'éloigne trop des quatre autres.

L'aspect des colonies, l'action sur les glucides et l'aptitude à la production de pigments distinguent, entre elles, ces quatre souches que l'ensemble de leurs caractères permet d'inclure dans la famille des *Pseudomonadaceae* (tableau c).

L'absence de pigmentation, la très faible dégradation des sucres et l'alcalinisation du lait rapprochent la souche 18 a67 de l'espèce *Acinetobacter viscolactis* (Mez, 1898) *nv. comb.*

Les colonies, de couleur crème, brillantes, lisses sont visqueuses et coulantes. L'examen microscopique révèle la présence de petits bâtonnets de 0,6 à 1,6 µ de long sur 0,5 µ de large, prenant souvent l'aspect coccoïde.

Le bouillon est troublé avec voile lisse adhérent aux parois du tube et dépôt visqueux.

La souche 5C d64 fait également partie du genre *Acinetobacter* et peut être considérée, par l'aspect de ses colonies rondes et blanches et l'absence de modification du lait, comme voisine d'*Acinetobacter candicans* (G. et P. Frankland), Brisou et Prévot, 1954, mais s'en distingue par la liquéfaction de la gélatine.

Les souches 18 f65 et 7B b67, pigmentées l'une en jaune-citron, l'autre en orange, appartiennent à la tribu des *Chromobactereae*, immobiles à pigment insoluble dans l'eau, c'est-à-dire au genre *Empedobacter*.

La liquéfaction de la gélatine, l'assimilation du glucose, saccharose et mannitol, le développement de colonies jaune-citron, brillantes et translucides, permettent de rattacher 18 f65 à l'espèce *Empedobacter dormitator* Whright 1895, dont elle s'éloigne uniquement par la réaction neutre sur lait.

La souche 7B b67 ne peut être identifiée à aucune espèce d'*Empedobacter*, notamment à cause de l'absence de protéolyse et par sa pigmentation orangée inhabituelle.

La souche 3D f65, constituée de bâtonnets de 1 µ de long, légèrement incurvés, peut être classée dans l'ordre des Spirillales et rattachée au

Caractères \ Souches	18 a67	5C d64	18 f65	7B b67	3D f65
Dilution d'isolement	10^{-4}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
Température optimum	20-28	30-37	30-37	30-37	20-30
Glucose	-	±	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	+
Saccharose	-	-	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	+
Mannitol	-	-	+	-	-
Amidon	-	-	-	-	-
Lait	- B	-	-	-	+
Gélatine	-	±	±	-	-
Réduction des nitrates	+	-	traces	-	-
Citrates (SIMMONS)	-	-	-	-	±
Hydrogène sulfuré	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-
Rouge de méthyle	-	-	-	-	-
Acétoïne	-	-	-	-	+

Tableau c : Bactéries à Gram négatif, immobiles

B = lait alcalinisé

genre *Microcyclus* par son absence de mobilité et surtout par la production d'anneaux, puis de corpuscules en sabot de cheval lors de sa croissance.Elle ne diffère de l'espèce unique *M. aquaticus* Orskov, 1928, que par la lente utilisation du glucose, lactose et maltose.

c) Bactéries à Gram positif, mobiles

Les 14 souches (tableau d) isolées sont mobiles par cils péritriches et produisent toutes des spores non déformantes à l'exception de 3E b65, asporogène. Cette dernière peut être rangée dans la famille des *Bacteriaceae*. Elle se présente sous forme de gros bâtonnets à extrémités arrondies de 2,5 à 9 µ de longueur, 1 à 1,2 µ de largeur, renfermant de nombreuses granulations chromaffines. Les colonies, rondes à irrégulières, blanchâtres et brillantes à l'état jeune, deviennent rugueuses et opâques en vieillissant. Le bouillon est troublé avec dépôt.

Cette souche aérobie dont l'espèce n'a pu être précisée s'apparente au genre *Bacterium* Ehrenberg 1828, *emend.*

Les treize souches, mobiles par cils péritriches et à spores non déformantes, correspondent à la définition du genre *Bacillus* Cohn 1872,*emend.*

La différenciation des espèces repose principalement sur l'aspect microscopique et sur l'allure des cultures en milieux solide et liquide.

Les souches 18 g67 et 7B a67 se développent, en milieu gélosé, sous forme de colonies blanchâtres, ternes, extensives et rugueuses à surface sèche et plissée. Au microscope, elles apparaissent constituées de bâtonnets de 2 à 5 µ de long sur 0,6 à 0,8 µ de large, isolés ou en petits amas. Après 48 heures de culture sur milieu solide, la coloration de Möeller met en évidence des spores cylindriques à position centrale dans un sporange non gonflé. Le bouillon reste clair et se couvre d'une pellicule épaisse et plissée,avec dépôt floconneux.

Ces caractères, ajoutés à ceux représentés dans le tableau d,permettent d'identifier ces souches à *Bacillus subtilis* Cohn 1872, *emend.* Prazmowsky, 1880.

La souche 2D b64 forme des colonies circulaires, lisses, brillantes et molles s'étalant facilement, de coloration jaune ocre. Ces colonies renferment des bâtonnets arrondis de 2 à 5 µ de long sur 1 à 1,5 µ de large, isolés ou en petites chaînes. Dans les vieilles cultures, de nombreuses granulations prennent naissance dans les cellules. Les spores sont cylindriques, de 1,5 à 2 µ de long, centrales et le sporange non gonflé. Le bouillon est troublé avec dépôt floconneux.

Cette souche 2D b64 peut être rattachée à l'espèce *Bacillus megaterium* de Bary 1884, de même que 18 c67 qui n'en diffère que par la réduction

Caractères \ Souches	3E b65	18 g67	7B a67	2D b64	18 c67	18 d67	2E a67	7B c67	3D c65	2E d67	18 e67	3D e65	7B f67	7B e67
Dilution d'isolement	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-1}
Température optimum	28-37	37-45	37-45	28-37	28-37	28-37	28-30	28	37	37	28	37	28	28
Sporange gonflé		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	±	-	±	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	-	±	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Amidon	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Lait	+A	+p	+p	+Ap	+Ap	+p	+Ap	+Ap	+p	+p	+Ap	+Ap	+p	+Ap
Gélatine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ l	+
Réduction des nitrates	-	+	+	-	+	+	+	+	±	traces	-	-	+	-
Citrates (SIMMONS)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrogène sulfuré	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Rouge de méthyle	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétoïne	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Tableau d : Bactéries à Gram positif, mobiles

A = lait acidifié
p = peptonisation
l = dégradation lente

des nitrates en nitrites et la faible utilisation du maltose, caractères non constants de l'espèce.

La souche 18 d67 donne naissance à des colonies semblables à celles de *Bacillus subtilis* mais à bords arborescents. A l'état fixé, elle se présente sous forme de bâtonnets à bouts carrés de 3 à 6 µ de longueur sur 1 µ de largeur, isolés et très fréquemment en courtes chaînes, à protoplasme granuleux. Les spores ovoïdes de 1 à 1,5 µ sont en position centrale dans des sporanges non renflés. Le bouillon se trouble fortement avec dépôt floconneux.

L'analyse des caractères morphologiques et biochimiques conduit à l'espèce *Bacillus cereus* G.et P. Frankland 1887.

La souche 2E a67 est identique à la précédente mais forme, sur milieu gélosé, des colonies arborescentes, très envahissantes typiques de la variété *mycoïdes* de *Bacillus cereus*.

La souche 7B c67 peut être considérée comme appartenant, également, à l'espèce *B. cereus*, le principal caractère de différenciation est la dégradation du mannitol.

Les souches 3D c65 et 2E d67 présentent des colonies blanc-jaunâtre, rugueuses, extensives, irrégulières. Les bâtonnets de 2 à 4 µ de long sur 0,5 à 0,8 µ, peuvent constituer, parfois, de très longs filaments. Les spores cylindriques, à 1 à 2 µ de longueur, sont centrales sans déformation du sporange. Le bouillon reste clair avec présence d'un voile plissé.

Ces deux souches possèdent tous les caractères de *Bacillus licheniformis* Chester 1901 *emend* Gibsen 1937, espèce à laquelle s'apparente la souche 18 e67 malgré la non réduction des nitrates.

La souche 3D e65, voisine de *B. licheniformis* s'en distingue par des cellules toujours isolées. L'absence d'amylolyse et la non réduction des nitrates la font appartenir à l'espèce *Bacillus pumilus* Gottheil 1941.

La souche 7B f67, du genre *Bacillus*, n'a pu être totalement identifiée : elle possède des caractères intermédiaires entre *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus*.

La souche 7B e67 se distingue des autres espèces décrites par la présence d'un sporange gonflé renfermant la spore cylindrique, non déformante, en position terminale à subterminale. Elle se rapproche le plus de l'espèce *Bacillus alvei* Cheshire et Cheyne 1895, mais en diffère par la non production d'indole et par ses caractères culturaux en milieu liquide : 7B e67 ne trouble pas le bouillon et forme un voile épais cireux tandis que la description classique de *Bacillus alvei* mentionne un trouble uniforme du milieu.

d) Bactéries à Gram positif, immobiles

Elles se composent de 13 souches (tableau e) constituées uniquement de cellules sphériques ou cocci (ordre des Micrococcales) et de 8 souches en bâtonnets, ces derniers se fragmentant ou non en éléments coccoïdes.

1/ La différenciation des souches formées de cocci à Gram positif, aérobies, repose sur la morphologie, l'arrangement des cellules et la production ou non de pigments.

Les souches 1E b64, 2E c67 et 3E c65, apparaissent sous forme d'amas non plans, réguliers, de forme cubique, caractéristiques de la famille des *Micrococcaceae* du genre *Sarcina*. Les colonies, rondes, brillantes et surélevées sont pigmentées en jaune. Le bouillon n'est pas troublé, le développement n'est visible que par la présence d'un dépôt jaune, abondant, au fond du tube de culture. L'absence d'attaque des sucres et la coagulation enzymatique du lait, complètant les caractères culturaux, conduisent à identifier ces trois souches à l'espèce *Sarcina lutea* Schroeter 1886.

Toutes les autres souches, par la présence de cocci à Gram positif groupés en amas irréguliers non plans, appartiennent au genre *Micrococcus* Cohn 1872.

La distinction en espèces est basée sur la faculté de produire des pigments et sur la réduction ou non des nitrates avec ou sans dégagement d'azote libre.

Trois souches, 18 c63, 2E b64 et 2E b67, pigmentées en jaune ne réduisent pas les nitrates. 18 c63 se présente sous forme de colonies circulaires de petite taille, brillantes et lisses. Le bouillon, très légèrement troublé, s'éclaircit par dépôt d'un sédiment jaunâtre. Glucose et saccharose sont utilisés et le lait ne coagule pas. Il n'y a pas protéolyse. Le phosphate monobasique d'ammonium peut servir d'unique source d'azote.

Cette description concorde avec celle de l'espèce *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872), Cohn 1872.

Les souches 2E b64 et 2E b67, de comportement identique, appartiennent à la même espèce. Elles se distinguent de *M. luteus* par la liquéfaction de la gélatine, la coagulation du lait et la présence, en milieu liquide, de trouble avec anneau et dépôt jaunâtres ; elles peuvent être rattachées à *Micrococcus flavus* Trevisan 1889.

Les sept dernières souches n'élaborent pas de pigments. Parmi celles-ci, 7D b63 et 3C b64 forment des cocci de 0,8 à 1,2 µ de diamètre, en paires, en tétrades et petits amas irréguliers donnant naissance à des colonies blanches, rondes, lisses, de petite taille.

La liquéfaction de la gélatine, la coagulation du lait et l'absence de réduction des nitrates permettent de les rapprocher de l'espèce

Caractères \ Souches	1E b64	2E c67	3E c65	18 c65	2E b64	2E b67	7D b63	3C b64	3D a65	3C a64	18 f67	3D b65	18 g65
Dilution d'isolement	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}
Température optimum	28	28	28	28	28	28	28	28	25-37	28	28-37	20-37	37
Glucose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Saccharose	-	-	-	+	-	-	$\frac{+}{-}$	-	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	+	+	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lait	+B	+B	+B	-	+A p	+A p	+ p	+ p	$\frac{+}{-}$ l	-	+A	$\frac{+}{-}$	+A
Gélatine	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Réduction des nitrates	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Indole	+	+	$\frac{+}{-}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrogène sulfuré	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétoïne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau e : Bactéries à Gram positif, immobiles (cocci)

A = lait acidifié
B = lait alcalinisé
p = peptonisation
l = dégradation lente

Micrococcus freudenreichii Guillebeau 1891.

L'absence de protéolyse et la non-coagulation du lait font appartenir les souches 3D a65 et 3C a64 à l'espèce *Micrococcus candidus* Cohn 1872. Les souches 18 f67 et 3D b65, de même métabolisme et de mêmes caractères morphologiques, sont très voisines de *Micrococcus varians* Migula 1900, par la réduction des nitrates et la non liquéfaction de la gélatine, seule diffère l'absence de pigmentation.

Enfin, la souche 18 g65, à croissance lente, n'a pu être identifiée à aucune espèce connue à cause de la non concordance des caractères.

2/ Parmi les huit souches de bactéries à Gram positif, immobiles, ne se présentant pas uniquement sous forme de cocci (tableau f), 18 d63, 18 d64, 18 c65 et 18 h67 peuvent être rattachées à la famille des *Bacteriaceae*. La très faible assimilation des sucres les place dans le genre *Brevibacterium* Breed 1953, *emend.*

Les souches 18 d63 et 18 c65 sont très semblables. En milieu gélosé, elles se développent sous l'aspect de colonies jaunâtres, circulaires, brillantes,de petite taille. Le bouillon est troublé avec dépôt d'un sédiment jaune. Toutes deux donnent des réponses négatives à l'ensemble des tests biochimiques. Elles ne diffèrent que par la taille des cellules : 18 d63 forment des bâtonnets de 2 à 2,5 µ de long sur 0,5 à 0,6 µ de large tandis que, dans la souche 18 c65, les formes coccoïdes abondent, ne dépassant pas 1 µ de long.

La souche 18 c65 se rapproche le plus de *Brevibacterium fulvum* (Zimmermann 1890), Breed 1953 mais s'en distingue par l'absence de protéolyse et par la pigmentation jaune.

La souche 18 h67 diffère des précédentes par la liquéfaction de la gélatine.

On peut donc considérer que 18 d63, 18 c65 et 18 h67 sont très voisines de *B. fulvum.*

La souche 18 d64 assimile le glucose et le maltose et liquéfie la gélatine. Elle s'éloigne de l'ensemble des espèces de *Brevibacterium.*

La souche 18 d65 est constituée de petits coccobacilles qui, en vieillissant, prennent l'allure de cocci, de 0,3 à 0,8 µ de diamètre, Gram positif labile. Sur milieu gélosé, les colonies sont circulaires, lisses et brillantes, colorées en rouge vermillon-rose. Le bouillon est troublé avec dépôt rose-rouge. La croissance est très nettement accélérée sur milieu à haut pouvoir nutritif (milieu de Briggs). Les glucides ne sont pratiquement pas utilisés, la gélatine subit une très lente liquéfaction.

L'aspect morphologique ne permet pas de classer cette souche dans l'ordre des Micrococcales ; elle peut être rattachée au sous-embranchement

Caractères \ Souches	18 d65	18 c65	18 h67	18 d64	18 d65	18 h65	18 i65	18 e65
Dilution d'isolement	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-3}
Température optimum	28	20-28	37	20-28	20-28	20-28	20-28	37
Glucose	-	-	- B	+	±	+	+	-
Maltose	-	-	- B	+	-	±	-	+
Saccharose	-	-	- B	-	-	+	±	+
Lactose	-	-	- B	-	-	-	-	+
Mannitol		-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-
Lait	-	-	- B	+ A	-	-	+ p	-
Gélatine	-	-	±	+	± l	-	-	+
Réduction des nitrates	-	-	-	-	±	+	+	-
Citrates(SIMMONS)	-	-	-	-	-	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrogène sulfuré	-	-	-	-	-	-	-	-
Rouge de méthyle	-	-	-	±	-	-	-	-
Acétoïne	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau f : Bactéries à Gram positif, immobiles, ne se présentant pas sous forme de cocci.

A = lait acidifié
B = lait alcalinisé
p = peptonisation
l = dégradation lente

Mycobacteria et à la famille des *Actinomycetaceae*. En tenant compte des restrictions signalées par PREVOT (185) dans son traité de Systématique,on peut identifier 18 d65 au genre *Micrococcus* et à l'espèce *Micrococcus rhodochrous* (Zopf 1891), Migula 1900, très proche de *Mycococcus* Krassilnikov, 1938.

Les souches 18 e65, 18 h65 et 18 i65, se composant de bâtonnets de taille variable. incurvés avec de nombreuses formes coccoïdes immobiles, non acido-résistantes, font partie de la famille des *Actinomycetaceae*.

La souche 18 h65 se multiplie, sur milieu solide, sous forme de colonies rondes, mates, granuleuses, surélevées, colorées en rose orangé. A l'état fixé, elle est constituée de bâtonnets ramifiés de 3 à 8 µ de long sur 1 µ de large, avec formation de chaînettes de "cocci". Le bouillon est troublé avec écume rose et dépôt. Les glucides ne sont pratiquement pas dégradés ; les nitrates sont réduits en nitrites.

Cette souche possède l'ensemble des caractères de *Nocardia corallina* Waskman et Henrici 1948.

La souche 18 i65 se rattache également à cette espèce n'en différant que par une meilleure utilisation des glucides.

Quant à 18 e65, elle se situe dans la famille des *Actinomycetaceae*, sans que nous puissions l'identifier complètement.

2 - Espèces fongiques

Les souches 21 c63, 18 c64, 5C b64, 18 i67 et 7B d67 ont été isolées à la dilution 10^{-3}, la souche 7D c63 à la dilution 10^{-2}. Elles appartiennent toutes à la même espèce possédant les caractères suivants. Les cellules sont rondes à ovales de 5 à 6 µ sur 2 à 4 µ, isolées ou en paires, se reproduisant par bourgeonnement multilatéral et jamais par cloisonnement transversal. Il n'y a pas de formation de pseudomycelium, même tardivement.

Sur milieu gélosé incliné, à la température optimum de développement de 28°C, les colonies sont circulaires, entières, brillantes, bombées, de 3 à 4 mm de diamètre et colorées en rose-rouge.

Sur moût de bière, les cultures se déposent au fond du tube,sans formation de voile ni d'anneau. Le milieu liquide à l'extrait de malt est troublé avec dépôt rose au fond du tube et anneau rose en surface.

Les cultures sur carotte et sur plâtre n'entraînent pas la formation d'ascospores.

Glucose, galactose, saccharose, maltose et arabinose sont dégradés par voie oxydative, réaction négative avec le lactose. Le test à l'arbutine est positif, l'assimilation du nitrate de potassium négative.

La pigmentation en rose, la non-utilisation des nitrates, la réaction positive au test de l'arbutine, l'assimilation des sucres et enfin la présence de cellules rondes à ovales autorisent, selon LODDER (148), à identifier ce micro-organisme à *Rhodotorula mucilaginosa* (Jörgensen) Harrison.

Les souches 18 b63, 18 b65 et 18 j67 isolées à la dilution 10^{-3} sont constituées d'hyphes septés de 2 à 3 µ de largeur avec production de spores sphériques de 2 µ de diamètre, lisses et brunes en chaînettes simples de 2 à 6 spores monocellulaires. La température de croissance est optimum entre 20 et 28°C, croissance nulle à 37°C.

Sur milieu gélosé, les colonies sont filamenteuses, blanches à centre gris-brun (spores), surélevées, de 5 mm de diamètre environ après 72 heures de culture. En milieu liquide, ces souches forment un voile blanc en surface se couvrant d'une pellicule brune. Le milieu reste clair, de nombreux hyphes y sont en suspension et se déposent lentement.

En présence d'une source d'azote minéral, glucose, galactose et saccharose sont assimilés. Les nitrates et les sulfates ne sont pas réduits.

L'absence de reproduction sexuée, la présence de conidiophores hyalins non différenciés à développement basidial portant des conidies unicellulaires non groupées dans des acervules conduisent au genre *Torula* (Classe *Fungi imperfecti*, ordre des Moniliales, famille des *Dematiaceae*). Il n'a pas été possible de déterminer l'espèce.

Nous sommes maintenant en mesure de situer la position taxinomique des 66 souches isolées en adoptant la classification des groupements naturels de bactéries établies par PREVOT (185).

Sous embranchement *Eubacteria*

Classe Asporulales

Ordre Micrococcales

Famille *Micrococcaceae*

Tribu *Micrococceae* : 13 espèces

Sarcina lutea	1E b64, 3E c65, 2E c67
Micrococcus luteus	18 c63
Micrococcus varians	3D b65, 18 f67
Micrococcus freudenreichii	7D b63, 3C b64
Micrococcus candidus	3C a64, 3D a65
Micrococcus flavus	2E b64, 2E b67
Micrococcus sp.	18 g65

Ordre Bactériales

Famille *Pseudomonadaceae*

Tribu *Pseudomonadeae* : 3 espèces

Pseudomonas geniculata	21 b63
Pseudomonas putida	2E a64
Pseudomonas oleovorans	18 b64

Tribu *Achromobactereae* : 6 espèces

Achromobacter iophagus	3D d65
Achromobacter sp.	18 e63, 5C c64, 3E a65
Acinetobacter viscolactis	18 a67
Acinetobacter candicans	5C d64

Tribu *Chromobactereae* : 3 espèces

Flavobacterium sp.	18 j65
Empedobacter dormitator	18 f65
Empedobacter sp.	7B b67

Famille *Enterobacteriaceae*

Tribu *Escherichiae* : 9 espèces

Aeromonas liquefaciens	18 a63, 21 a63, 7D a63, 18 a64, 18 a65, 18 b67.
Aeromonas sp.	1E a64
Paracolobactrum aerogenoides	5C a64, 2D a64

Famille *Bacteriaceae*

Tribu *Eubactereae* : 1 espèce

Bacterium sp.	3E b65

Tribu *Brevibactereae* : 4 espèces

Brevibacterium sp.	18 d63, 18 d64, 18 c65, 18 h67.

Ordre Spirillales

Famille *Spirillaceae* : 1 espèce

Microcyclus aquaticus	3D f65

Classe Sporulales

Ordre Bacillales

Famille *Bacillaceae* : 13 espèces

Bacillus subtilis	18 g67, 7B a67
Bacillus cereus	18 d67, 7B c67
Bacillus licheniformis	3D c65, 18 e67, 2E d67
Bacillus alvei	7B e67
Bacillus megaterium	2D b64, 18 c67
Bacillus cereus var. mycoides	2E a67
Bacillus pumilus	3D e65
Bacillus sp.	7B f67

Sous-embranchement *Mycobacteria*

Classe Actinomycétales

Ordre Actinobactériales

Famille *Actinomycetaceae* : 4 espèces

Nocardia corallina	18 h65
Nocardia sp.	18 i65
Micrococcus rhodocrous	18 d65
Actinomycetaceae	18 e65

Espèces fongiques : 9 espèces

Rhodotorula rubra	21 c63, 7D c63, 18 c64, 5C b64, 18 i67, 7B d67.
Torula sp.	18 b63, 18 b65, 18 j67.

C - REPARTITION DES ESPECES: LEURS RELATIONS AVEC LE MILIEU NATUREL

L'abaissement de pH des liqueurs noires, la structure et la texture du sol, constituent des conditions de vie favorables au développement des micro-organismes, la porosité d'origine structurale exerçant une action efficace sur l'aération du milieu.

L'importance de la micropopulation varie, comme l'a montré l'analyse quantitative, dans le temps mais aussi selon le lieu de prélèvement.

Très élevée au voisinage de l'épandage, elle diminue ensuite rapidement et atteint, aux limites extrêmes du terrain, des valeurs proches de celle de l'eau naturelle.

La connaissance des différentes espèces permettra de suivre l'évolution de la microflore au cours des années et dans l'espace. En premier lieu, nous décrirons les souches isolées à proximité du lieu de l'infiltration, c'est-à-dire dans une région directement soumise aux variations de débit et de composition des liqueurs noires déversées. Dans un deuxième temps, nous étudierons l'évolution microbiologique des eaux infiltrées suivant les sens principaux d'écoulement.

Nous ne prétendons pas avoir isolé tous les germes vivants dans ces eaux ; pour se faire, l'examen d'un trop grand nombre d'échantillons serait indispensable. De même, au cours des prélèvements, quelques espèces, moins répandues, peuvent passer inaperçues. Il n'en demeure pas moins que, malgré la complexité du problème, cette étude constitue un essai de l'écologie des micro-organismes vivant dans les eaux résiduaires.

Le tableau n° 16 regroupe l'ensemble des souches isolées réparties en fonction de la demande chimique en oxygène des eaux. Son examen appelle quelques remarques. Les fortes valeurs d'oxydabilité des eaux au puits 7B (180 m de l'épandage) proviennent, en grande partie, du rejet antérieur d'effluents très concentrés. On remarque qu'elles n'ont aucune répercussion sur les puits E situés à l'Est du terrain, le sens d'écoulement des eaux devant s'effectuer vers le Nord en direction du puits F3.

1 - Souches isolées à proximité du lieu de l'infiltration (puits 18)

On remarque d'abord que le nombre d'espèces isolées diffère suivant l'année du prélèvement.

Au mois d'avril 1963, la microflore se compose de 600 000 germes/ml répartis en 7 espèces principales.

L'apport réduit d'effluents pendant l'année 1963 et au 1er trimestre de 1964, associé à une faible pluviosité pendant cette dernière période, se traduit par une diminution de la population microbienne lors des prélèvements du mois d'avril 1964 : la microflore, de 200 000 germes/ml, renferme 4 espèces dominantes.

L'analyse des prélèvements du mois d'avril 1965 indique, contrairement à celle de l'année précédente, un accroissement du nombre de germes atteignant 50 millions par ml. Le déversement d'un volume important d'eaux résiduaires en 1964, la transformation du dispositif d'épandage créant une meilleure aération des eaux et facilitant leur ensemencement naturel constituent autant de facteurs favorables au développement des micro-organismes. A ceux-ci, s'ajoute l'influence des précipitations atmosphériques abondantes

au 1er trimestre 1965. Dix espèces, très diversifiées, sont dénombrées. Les mêmes observations peuvent être faites en 1967.

La diversité des espèces semble donc en rapport avec l'importance numérique de la microflore totale.

Si l'on examine attentivement la liste des souches, on constate que deux d'entre elles, *Aeromonas liquefaciens* et *Brevibacterium sp.* demeurent permanentes dans le temps. On peut donc les considérer comme bien adaptées à ce milieu et insensibles aux fluctuations de concentration de l'effluent.

A. liquefaciens possède, d'après l'étude de ses caractères biochimiques, un équipement enzymatique très complet. Celui-ci permet une assimilation totale des glucides jusqu'au stade final de libération de gaz carbonique, une forte protéolyse et la production d'hydrogène sulfuré. Ce micro-organisme, au métabolisme simple, sans aucune spécialisation, n'exige pas la présence d'une source d'azote organique et réduit très activement les nitrates.

Brevibacterium sp. diffère en tous points de l'espèce précédente. Son équipement enzymatique, très limité, lui impose pour sa croissance une source d'azote organique (acides aminés, peptides, polypeptides) et des facteurs de croissance. Cette souche ne peut, vraisemblablement, se développer que grâce à l'utilisation de produits élaborés par les autres micro-organismes coexistant avec elle. Ces substances nouvelles, biodégradables, proviennent de la décomposition des matières organiques et de l'autolyse des corps bactériens. On peut aussi envisager l'apport de facteurs de croissance par les interactions sol-effluent. Cependant, nous ne devons pas exclure la possibilité de dégradation de matières nutritives plus complexes sous prétexte que nous en ignorons la nature.

A côté de ces souches permanentes, on retrouve fréquemment deux autres espèces : *Rhodotorula mucilaginosa* et *Torula sp.*

Rh. mucilaginosa renferme un équipement enzymatique moins important que celui d'*A. liquefaciens* notamment à cause de l'absence de réduction de sels minéraux. La dégradation des glucides et des glucosides permet d'envisager son rôle dans l'attaque de substances complexes.

Torula sp., non isolé en 1964, n'utilise pas les sels minéraux mais conserve la faculté de métaboliser l'azote sous forme minérale. *In vitro*, son activité biochimique se traduit par une dégradation modérée des sucres simples et des polyholosides. Sa présence, pratiquement constante, à proximité du lieu de l'infiltration, peut s'avérer intéressante car il est bien établi que de nombreuses espèces fongiques peuvent dégrader les composés humoligniques.

Enfin, on note l'apparition et la disparition, apparemment

fortuites, de certaines souches temporaires. Elles appartiennent aux familles des *Pseudomonadaceae, Actinomycetaceae, Bacillaceae* et *Micrococcaceae*. La famille des *Pseudomonadaceae* est représentée par quatre espèces :*Ps. oleovorans* (1964), *Empedobacter dormitator, Flavobacterium sp.* (1965) et *Acinetobacter viscolactis* (1967), cette dernière a un métabolisme complexe tandis que les autres espèces sont nettement moins spécialisées.

Les micro-organismes appartenant à la famille des *Actinomycetaceae* (*Nocardia corallina* et espèces voisines, *Micrococcus rhodocrous*) apparaissent en 1965 et ne sont plus retrouvés dans les prélèvements de 1967. Il convient de remarquer que, du mois de juin 1965 au mois de septembre 1966, les liqueurs noires déversées dans les bassins sont fortement concentrées. Les effets se font encore sentir en 1967, avec des eaux à 722 mg d'O_2/l d'oxydabilité. Nous avons déjà signalé qu'une forte concentration des eaux résiduaires paraissait inhiber le développement de la microflore.

En 1967, les eaux renferment, pour la première fois, quatre espèces de *Bacillus* : *B. megaterium, B. cereus, B. licheniformis* et *B. subtilis* au métabolisme simple. Elles se développent donc dans des eaux chargées en matières organiques. La présence de spores leur permet de subsister dans des conditions défavorables.

A proximité de l'épandage, quatre espèces constituent la microflore de base de ces eaux : *A. liquefaciens, Brevibacterium sp., Rh. mucilaginosa* et *Torula sp.* L'apparition et la disparition de certaines souches semblent liées à l'influence de facteurs externes. Les lignines, polymères riches en carbone en groupements méthoxyle, hydroxyle alcoolique et phénolique, représentent une des matières premières entrant dans la synthèse des substances humiques. On peut admettre que les alcali-lignines subissent d'abord un processus d'humification. En présence de populations microbiennes complexes attaquant les substances facilement biodégradables, en particulier les glucides, la lignine subit des altérations partielles comme le signalent BROADBENT (34), FLAIG et collaborateurs (84) portant sur ses groupements fonctionnels (diminution du taux de méthoxyle, enrichissement en groupements carbonyle, carboxyle et hydroxyle phénolique) et sur l'incorporation d'azote sous forme non hydrolysable. Cette phase a lieu, vraisemblablement, à proximité du lieu de l'infiltration.

2 - Evolution des micro-organismes suivant les sens d'écoulement des eaux

Les eaux infiltrées cheminent dans le sous-sol suivant deux directions principales : l'une vers le Nord en direction du puits F3, l'autre plus importante, orientée Sud-Ouest/Nord-Est vers l'Eyre. On peut donc concevoir que les micro-organismes évolueront, surtout, suivant ces deux voies d'écoulement préférentielles.

a) Vers le Nord

Les eaux du puits 18 comportent, en 1963, cinq espèces : *A. liquefaciens*, *Torula sp.*, *M. luteus*, *Brevibacterium sp.* et *Achromobacter sp.* déjà signalées.

A 60 m, au Nord, au puits 21, la population microbienne baisse et atteint 120 000 germes/ml, répartis en trois espèces. On retrouve *A. liquefaciens* constituant l'espèce dominante associé à *Pseudomonas geniculata* et à *Rh. mucilaginosa*. *Ps. geniculata* présente un métabolisme complexe n'assimilant que le glucose mais se caractérise par une protéolyse très active.

Au puits 7D, à 340 m du lieu de l'infiltration, l'activité microbienne diminue (25 000 germes/ml). La forte coloration des eaux indique, malgré l'absence de mesures d'oxydabilité, une teneur en matières organiques très élevée. Comme précédemment, *A. liquefaciens* prédomine tandis que *Rh. mucilaginosa* également présente, marque une légère décroissance étant isolée à la dilution 10^{-2} au lieu de 10^{-3} au puits 21. La 3ème espèce est constituée par *Micrococcus freudenreichii*, glucidolytique et protéolytique.

Suivant la direction Nord, la population microbienne diminue. *A. liquefaciens*, isolé dans tous les prélèvements, constitue l'espèce dominante associé fréquemment à *Rh. mucilaginosa*.

b) Suivant la direction Sud-Ouest/Nord-Est

Elle est rendue possible par l'examen des puits 18,5C, 2D, 1E et 2E.

On constate, lorsque l'on s'éloigne du lieu de l'infiltration, que la microflore totale diminue progressivement : en 1964, 200 000 germes par ml au puits 18, 20 000 au 5C, 9 000 au 2D et 3 000 au puits 2E.

Les eaux du puits 18, ayant une demande chimique en oxygène de 330 mg/l, contiennent quatre espèces : *A. liquefaciens*, *Brevibacterium sp.* déjà isolées en 1963, *Rh. mucilaginosa*, présente l'année précédente aux puits 21 et 7D et une nouvelle espèce *Pseudomonas oleovorans* réduisant les nitrates et dégradant l'amidon et le mannitol.

Au puits 5C (260 m de l'épandage), l'oxydabilité augmente et atteint 550 mg d'O_2/l. Quatre espèces sont isolées : *Paracolobactrum aerogenoides*, espèce dominante, très proche d'*A. liquefaciens*, ne s'en différencie que par la présence d'une ciliature péritriche et la non production d'indole; les autres caractères biochimiques demeurent identiques. *Rh. mucilaginosa* est isolée à la même dilution (10^{-3}) qu'au puits 18. Deux nouvelles espèces apparaissent (dilution 10^{-1}, la plus faible) : *Achromobacter sp.* et *Acinetobacter candicans*, d'activité métabolique faible.

Le puits 3C, à 100 m à l'Ouest du précédent, se trouve à l'écart du cheminement des eaux. Il renferme une microflore totalement différente

(2 500 germes/ml) constituée uniquement de deux espèces: *Micrococcus candidus* et *M. freudenreichii*, cette dernière déjà présente en 1963 au puits 7D dans des eaux fortement oxydables. Des observations du même ordre peuvent être faites au puits 3D (80 m au Nord du 3C) en 1965. La population microbienne, identique en nombre (2 500 germes/ml), comprend des espèces très voisines de *Micrococcus*, *Bacillus*, mais on ne retrouve pas *A. liquefaciens*, *P. aerogenoides* ou *Rh. mucilaginosa* comme au puits 5C.

Au puits 2D (340 m de l'épandage), les eaux résiduaires, en voie d'épuration, ne renferment plus que 190 mg/l de substances oxydables. *P. aerogenoides* et *Bacillus megaterium* constituent la majeure partie de la microflore.

Enfin, à 420 m de l'épandage, dans des eaux dont l'oxydabilité varie de 115 à 220 mg d'O_2/l, on retrouve une espèce (1E a64) très proche de *A. liquefaciens* et de *P. aerogenoides* ne s'en distinguant que par l'élaboration d'un pigment brun soluble, et de nouvelles espèces : *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus* et *Pseudomonas putida*.

Quatre souches paraissent avoir un habitat bien défini : *Aeromonas liquefaciens*, *Torula sp.* et *Brevibacterium sp.* à proximité de l'épandage et *Sarcina lutea*, à 420 m du lieu de l'infiltration dans des eaux en partie épurées.

D'autres micro-organismes se retrouvent dans des régions très éloignées les unes des autres et constituent des souches omni-présentes. Leur zone d'activité est beaucoup plus étendue. A celles-ci appartiennent *Rh. mucilaginosa* et les espèces de *Micrococcus*.

Rh. mucilaginosa se répand en moyenne jusqu'à 260 mètres de l'épandage, dans des eaux à demande chimique en oxygène élevée.

La répartition des espèces du genre *Micrococcus* semble fortement influencée par la concentration des eaux en matières organiques.

On remarque que *Micrococcus luteus* et *Micrococcus sp.* (18 g65) se développent uniquement dans des eaux dont l'oxydabilité ne dépasse pas 400 mg d'O_2/l soit au puits 18 en 1963 et 1965.

M. freudenreichii, *M. candidus* et *M. varians* vivent de façon préférentielle dans des eaux très colorées, d'oxydabilité supérieure à 550 mg d'O_2/l, c'est-à-dire de 1963 à 1965, dans des régions comprises entre 260 et 340 m du lieu de l'infiltration (puits 3C, 5C, 7D).

La présence apparemment paradoxale de *M. varians* au puits 3D en 1965 et au puits 18 en 1967 s'explique si l'on tient compte des valeurs de la demande chimique en oxygène qui sont respectivement de 575 et 722 mg d'O_2/l.

Comme nous l'avons déjà envisagé lors de l'étude des interactions sol-effluent, la surcoloration des eaux peut être d'origine microbienne et

s'interpréter, en partie, par l'oxydation de composés phénolés libérés sous l'action des micro-organismes situés à proximité de l'épandage.

Ainsi, entre 200 et 300 m de distance du lieu de l'infiltration se déroulerait la seconde phase des processus d'humification des alcali-lignines. La présence de *Micrococcus varians*, en particulier, semble le prouver. JAYASANKAR et BHAT (128) signalent l'aptitude de ce micro-organisme à oxyder ou à dégrader les phénols, selon les conditions de culture. D'après ces auteurs, *M. varians*, en culture stationnaire et *in vitro*, condense les composés phénolés par voie oxydative avec production de mélanine. En culture aérée, la croissance est maximale sans production appréciable de pigments, les deux processus de dégradation et d'oxydation ne s'excluant pas.

Micrococcus flavus n'est rencontré que dans des eaux déjà épurées dont la teneur en matières organiques est égale ou inférieure à 200 mg d'O_2/l. Son comportement s'apparente à celui de *Sarcina lutea*.

Parmi les souches temporaires se placent les *Pseudomonas* et *Achromobacter*. *Ps. geniculata* n'est isolé qu'en 1963 au puits 21. L'année suivante deux nouvelles espèces apparaissent : *Ps. oleovorans* au puits 18 et *Ps. putida* au métabolisme très voisin à plus de 400 m de distance de l'épandage (puits 2E). A partir de 1965, tous ces micro-organismes disparaissent sans raison apparente, les eaux résiduaires présentant une composition relativement stable. On peut, cependant, remarquer qu'à partir de 1964, le lessivage de l'humus semble terminé; à cette date, les alcali-lignines, fortement biorésistantes, constituent la majeure partie des matières organiques en solution. Ce changement dans la composition des eaux pourrait être à l'origine du déclin des *Pseudomonas*.

Achromobacter sp. isolé au puits 18, en 1963, se propage l'année suivante au puits 5C (260 m du lieu de l'infiltration) dans des eaux fortement oxydables. En 1965, *Achromobacter iophagus* et *Achromobacter sp.* continuent leur progression et atteignent les puits les plus éloignés de l'épandage (3E) et ne sont plus retrouvés en 1967 dans des eaux nettement plus concentrées.

Parmi les micro-organismes ayant également disparu, appartiennent les espèces de la famille des *Actinomycetaceae* isolées en 1965 au puits 18 et non retrouvées dans les prélèvements de 1967, pour les raisons précédemment invoquées.

En revanche, d'autres espèces apparaissent. Le développement le plus spectaculaire est constitué par celui des *Bacillus*. En 1964, une seule espèce, *B. megaterium* est identifiée dans des eaux dont l'oxydabilité est inférieure à 200 mg d'O_2/l (puits 2D à 340 m de l'épandage). L'année suivante, deux nouvelles espèces, *B. pumilus* et *B. licheniformis*, sont isolées dans des eaux à forte teneur en matières organiques (puits 3C à 260 m du lieu de l'infiltration).

Enfin, en 1967, le genre *Bacillus* se répand très activement dans

l'ensemble du terrain : *B. megaterium, B. subtilis, B. licheniformis, B. cereus* et *B. alvei* aux puits 18 et 7B (40 à 180 m de l'épandage) et à l'extrémité Est du terrain (puits 2E) *B. licheniformis* et *B. cereus* var. *mycoides*.

Il semble donc que deux processus distincts comparables à l'humification et à la déshumification se déroulent dans le terrain d'épandage suivant la distance du lieu de l'infiltration.

L'humification des alcali-lignines s'effectue en deux phases. En premier lieu, à proximité de l'épandage, les substances facilement biodégradables contenues dans les liqueurs noires favorisent le développement d'une population microbienne complexe sujette à variations mais constituée de quelques souches permanentes dans le temps (*Aeromonas liquefaciens, Brevibacterium sp., Rhodotorula mucilaginosa* et *Torula sp.*). L'activité microbienne se traduit par l'élaboration d'enzymes très variées altérant partiellement les alcali-lignines et libérant des produits phénolés simples.

Dans une seconde phase, entre 200 et 300 m de l'épandage, les phénols simples sont condensés sous l'influence d'oxydases microbiennes en donnant naissance à des substances très colorées comme l'ont signalé, par ailleurs, JACQUIN (125) et FLAIG (83). Les micro-organismes responsables de cette oxydation paraissent appartenir aux genres *Micrococcus, Bacillus, Empedobacter, Achromobacter* et *Rhodotorula*. L'oxydation des composés phénolés peut s'accompagner d'une dégradation. Les processus de déshumification consistent en l'attaque microbienne du complexe humo-lignique aboutissant à la décoloration des eaux à la limite Est du terrain. Parmi les germes isolés à cette distance de l'épandage, on rencontre *Sarcina lutea, Micrococcus flavus, Pseudomonas putida*.

Chapître IV

BIODEGRADATION DES LIQUEURS NOIRES

Les traitements biologiques classiques - par boues activées ou lits bactériens - s'ils entraînent la dégradation des substances facilement assimilables contenues dans les eaux résiduaires et abaissent la demande biologique en oxygène, demeurent pratiquement sans effet sur la réduction de la demande chimique en oxygène. Celle-ci est due principalement à la présence, à l'état dissous, d'alcali-lignines fortement biorésistantes et l'on remarque que la coloration des effluents, avant et après traitement, ne diminue pas de façon appréciable. Il importe de savoir si une microflore adaptée à ce milieu pourra dégrader, partiellement tout au moins, les composés ligneux.

Le terrain d'épandage étudié fonctionne comme un gigantesque lit bactérien. Il en diffère par l'accroissement considérable du temps de séjour des eaux résiduaires dans le sol, favorable à la mise en oeuvre de mécanismes biologiques. A ce sujet, les études microbiologiques, quantitative et qualitative, prouvent, de façon indéniable, son efficacité. Aux interactions sol-effluent de nature physico-chimique, s'ajouteront les interventions d'origine biologique. La mise en évidence de leur rôle peut être obtenue expérimentalement de deux façons :

- par l'utilisation du dispositif expérimental d'infiltration déjà décrit au chapître des interactions sol-effluent.

- par l'étude, *in vitro*, des différentes souches cultivées sur eau résiduaire sans l'intervention du sol.

A - INFLUENCE DES MICRO-ORGANISMES SUR LES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DES LIQUEURS NOIRES.

On a remarqué précédemment, lors de l'utilisation du dispositif d'épandage (chapître II), la production d'hydrogène sulfuré dans la partie inférieure de la colonne, après un mois d'expérimentation. Les numérations effectuées sur milieu de STARKEY, indiquent la présence de germes sulfato-réducteurs (*Desulfovibrio desulfuricans*) jusqu'à la dilution 10^{-3}. Ce développement microbien s'accompagne d'une augmentation de la coloration alors que les valeurs du pH tendent à s'élever de 0,2 à 0,3 unité. Il n'a pas été

possible de poursuivre longtemps l'étude microbiologique de cette colonne à la suite de son colmatage précoce : les résultats obtenus ne sont donc que fragmentaires.

L'étude analytique, sur colonnes constituées par les différents horizons du sol (chapitre II), précise cette influence des micro-organismes et en particulier celle des bactéries sulfato-réductrices, les premières mises en évidence.

En présence d'un milieu de Starkey, incolore, à pH 7,50, ensemencé avec une souche pure de *Desulfovibrio desulfuricans* (tableau a), les pH accusent des valeurs supérieures de 0,2 à 0,3 unité par rapport à celles qui étaient relevées sur milieu non ensemencé.

Horizons \ Jours		1	2	3	5
Terre arable	pH	4,40	5,30	6,80	6,70
	Col.	1	26	98	29
Allos noir	pH	4,70	4,60	5,00	5,20
	Col.	0	0	17	6
Allos jaune	pH	5,10	5,40	5,90	5,90
	Col.	0	10	37	11
Sable	pH	7,90	7,70	8,00	7,80
	Col.	2,5	0	22	6
Milieu d'alimentation (témoin)	pH	7,50	8,10	8,40	8,40
	Col.	0	0	0	0

Tableau a : Variations de pH et de coloration (mesurée à 5 500 Å) d'un milieu de Starkey ensemencé avec *Desulfovibrio desulfuricans*, après infiltration sur différents horizons du sol.

La principale différence réside en un retour beaucoup plus rapide à la neutralité des eaux filtrées sur terre arable, faisant suite à

une phase d'acidification. Il faut également noter un ralentissement de l'écoulement en présence de bactéries. Les eaux sont surcolorées après filtration dans les différentes couches mais surtout au contact de la terre arable et de "l'allos jaune".

Avec le milieu constitué d'eaux résiduaires et de milieu de Starkey (tableau b), les résultats sont du même ordre c'est-à-dire qu'ils montrent une tendance à l'alcanisation surtout en présence de terre arable et une surcoloration très élevée.

Horizons \ Jours		1	2	3	5	6	8	10	11	12	13	15	17	19
Terre arable	pH	4,65	5,80	7,30	7,20	7,50	7,70	8,30	8,10	8,40	8,40	8,40	8,20	7,80
	Col.	22,5	35	29	33	40,5	55	54	32	35	22,5	24	29	21
Allos noir	pH	4,70	4,80	4,90	5,00	5,20	5,40	5,70	5,60	5,80	5,90	6,30	6,70	7,10
	Col.	6,5	5	8	7	7	11	13	17	27	18	21	28	28,5
Allos jaune	pH	5,20	5,60	6,20	6,50	6,50	6,90	7,20	7,30	7,70	7,60	7,20	7,60	8,10
	Col.	8,75	10	13	14	13	20	21	16	20	13	13,5	19	21
Sable	pH	7,50	7,60	8,00	7,70	7,90	8,00	8,30	8,30	8,20	8,10	8,20	8,30	8,40
	Col.	14	11	13	10,5	7	10	11	9	16	10	8	9	9
Milieu d'alimentation	pH	7,20	8,10			7,40								
	Col.	18	21			9								

Tableau b : Variations de pH et de coloration des eaux résiduaires et milieu de Starkey, ensemencées à l'aide de *Desulfovibrio desulfuricans*.

Le développement de micro-organismes, en particulier de germes sulfato-réducteurs, se traduit par une surcoloration et une alcalinisation des eaux en contact avec les horizons du sol.

B - ROLE DES MICRO-ORGANISMES DANS LA DEGRADATION DES LIQUEURS NOIRES

Les eaux résiduaires, fortement alcalines et très pauvres en éléments nutritifs azotés et phosphatés, ne constituent pas, à l'état brut, un milieu favorable au développement, *in vitro*, de micro-organismes. Il convient, avant toute mise en culture, d'abaisser le pH à la neutralité et de pallier les carences. Des recherches préliminaires s'imposent. Elles consistent, comme dans toute étude microbiologique, à élaborer des milieux de culture permettant un développement maximum des germes à étudier et, parallèlement, à mettre au point des méthodes d'analyse traduisant les résultats de leur activité épuratrice.

1 - Recherche des conditions de culture optimales

Afin d'éviter la dénaturation des liqueurs noires par une neutralisation artificielle et brutale, l'eau employée pour la confection des milieux de culture, provient exclusivement du puits 7, proche du lieu d'épandage. Cette eau subit une neutralisation naturelle au cours de son cheminement souterrain et, par voie de conséquence, s'enrichit en matières organiques du sol et éventuellement en facteurs de croissance, indispensables à la multiplication microbienne. Le séjour bref des liqueurs noires dans le sol élimine les risques d'une bio-dégradation avancée.

Il convient de remarquer que, malgré l'utilisation constante d'eau résiduaire de même provenance, on observe des variations dans les caractéristiques physiques et chimiques des prélèvements successifs d'eau servant à la confection des milieux, variations dues principalement au traitement et à la concentration au départ de l'usine. Ces fluctuations expliquent que, pour chaque expérience, figure un témoin.

L'eau résiduaire ainsi prélevée, employée non diluée, doit être supplémentée en matières azotées et phosphatées. De nombreux auteurs et en particulier BREBION (25) conseillent l'emploi du phosphate bibasique d'ammonium, substance "créant un équilibre judicieux entre phosphore et azote". Nous nous sommes rallié à cette solution.

D'autre part, DUCHAUFOUR (78), BUCKMANN et BRADY (39) signalent que la biodégradation des lignines dans le sol s'accroît en présence d'un taux élevé d'azote. Les études, *in vitro*, sur la ligninolyse fongique, citées par SCHUBERT (202) mettent en relief l'importance de l'aération des cultures sur la réduction des composés ligneux.

Il apparait donc primordial de connaître expérimentalement la teneur optimum en azote et de procéder ensuite à des cultures aérées.

a) Influence des apports azotés en milieux non tamponnés.

L'influence de la concentration en azote sur la dégradation des

liqueurs noires a été déterminée pour trois valeurs différentes, exprimées en N ‰.

- à 0,1 et 0,2 ‰ en présence de phosphate bibasique d'ammonium.

- à 2 ‰ à l'aide de nitrate d'ammonium et en palliant la carence en élément phosphaté par l'adjonction de phosphate bipotassique. Cette teneur correspond à celle d'un sol riche en azote. L'abandon du phosphate bibasique d'ammonium au profit du nitrate d'ammonium s'explique par la nécessité d'obtenir, sous un faible volume, un taux élevé d'azote sans augmenter exagérément la concentration en phosphate.

Le milieu le plus adapté au développement des germes servira de support aux cultures, aérées par agitation mécanique, les fioles d'Erlenmeyer reposant sur une table à secousses. De façon à accélérer la croissance, on ajoute à l'eau résiduaire une source énergétique carbonée sous forme de glucose dont les teneurs varient, suivant les milieux, de 1 à 5 g par litre.

La composition exacte des différents milieux utilisés sera indiquée au cours de l'exposé des résultats. Sauf indication contraire, l'incubation des cultures dure sept jours à l'étuve à 28°C.

Il n'est pas inutile de rappeler les types d'analyse employés :

- mesure du pH
- détermination de la coloration vraie par mesure d'absorption lumineuse à longueur d'onde définie.
- dosage de l'oxydabilité totale correspondant à la teneur en matières organiques.
- dosage de l'oxydabilité des alcali-lignines par précipitation sulfurique des composés ligneux en solution dans le surnageant du milieu de culture.

Toutes les valeurs obtenues, comparées à celles d'un témoin stérile placé dans les mêmes conditions d'expérience, rendront possible l'évaluation du pouvoir de dégradation de chaque type de micro-organismes.

Cultures sur milieu à 0,1 ‰ d'azote

Les premiers essais ont été réalisés à partir de trois souches isolées, en 1963, à proximité de l'épandage dans les eaux prélevées aux puits 18 et 21 : 18 a63 (*Aeromonas liquefaciens*), 21 b63 (*Pseudomonas geniculata*)et 21 c63 (*Rhodotorula mucilaginosa*). L'étude particulière de ces souches s'explique par leur présence aux dilutions les plus élevées (10^{-4}) ; elles constituent la microflore dominante de ces eaux et peuvent être considérées, logiquement, comme bien adaptées aux liqueurs noires.

Le premier milieu utilisé se compose d'eau résiduaire, non diluée, supplémentée en azote et phosphore à l'aide de 0,5 g par litre de phosphate bibasique d'ammonium. Les teneurs en azote et en phosphore atteignent

respectivement 0,1 ‰ et 0,12 ‰. Le glucose, à 1 g par litre, fournit la source énergétique.

Tous les micro-organismes se développent de façon satisfaisante comme le montre le tableau "c", regroupant les résultats obtenus :

Souches	pH	Coloration à 8 500 Å		Oxydabilité totale	
		mesure	% réduct	mg d'O_2/l	% réduct.
Témoin	7,50	10,5	0	870	0
18 a63 *Aeromonas liquefaciens*	5,70	10,5	0	485	44
21 b63 *Pseudomonas geniculata*	6,90	10	5	440	49
21 c63 *Rhodotorula mucilaginosa*	6,95	10	5	590	32

Tableau c : Cultures sur milieu à 0,1 ‰ N et à 1 ‰ de glucose

Le milieu témoin présente un pH voisin de la neutralité. Sous l'influence de *Rh. mucilaginosa* (21 c63) et de *Ps. geniculata* (21 b63), peu de modifications interviennent. Avec *A. liquefaciens* (18 a63), l'acidification s'accroît fortement.

Les colorations des liquides de culture diffèrent peu de celle du témoin. On note cependant une perte de coloration de l'ordre de 5 % de la valeur d'origine en présence de *Rh. mucilaginosa* et de *Ps. geniculata*.

L'enrichissement du milieu en substance énergétique élève l'oxydabilité de l'eau à 870 mg d'O_2/l. La perte en matières organiques varie de 44 à 49 % exception faite de *Rh. mucilaginosa* qui n'entraîne que 32 % de perte.

La faible décoloration du milieu, malgré un développement correct des micro-organismes, permet de conclure que la perte assez élevée de matières organiques provient, en grande partie, du glucose consommé. Cependant, elle laisse entrevoir un début de dégradation des composés ligneux.

Afin de tenter d'obtenir des résultats plus satisfaisants, la teneur en glucose est portée à 3 g par litre. Mise à part la concentration

supérieure en glucose, le milieu de culture est identique au précédent. *Torula sp.* indexé 18 b63, champignon imparfait, complète les souches précédentes (tableau d).

Souches	pH	Coloration à 8 500 Å		Oxydabilité totale	
		mesure	% réduct.	mg d'O_2/l	% réduct.
Témoin	7,20	12,5	0	1 900	0
18 a63 *A. liquefaciens*	5,40	12	4	1 375	27
18 b63 *Torula sp.*	6,50	6	52	1 250	34
21 b63 *Ps. geniculata*	4,60	10	20	980	48
21 c63 *Rh. mucilaginosa*	7,10	12	4	1 310	31

Tableau d : Cultures sur milieu à 0,1 ‰ N et 3 ‰ de glucose

Sous l'influence de *Rh. mucilaginosa* (21 c63) et de *A. liquefaciens* (18 a63), les variations de pH et de coloration demeurent conformes aux premières observations. *Ps. geniculata* (21 b63) paraît d'un comportement différent : il acidifie fortement le milieu, amenant le pH à la valeur de 4,60 et entraîne une perte de couleur de 20 %.

Les résultats les plus spectaculaires s'observent dans les cultures de *Torula sp.* (18 b63) qui élimine 52 % de la coloration initiale à un pH légèrement inférieur à la neutralité. La demande chimique en oxygène de 1 900 mg/l pour le témoin, décroît de 48 % avec *Ps. geniculata* et de 27 à 34% avec les autres souches mais reste élevée en fin d'expérience.

On remarque que l'augmentation de la teneur en glucides s'avère peu bénéfique sauf dans le cas de *Ps. geniculata* où elle permet une décoloration importante du milieu concomitante d'une forte acidification par assimilation incomplète du glucose. On peut donc penser à améliorer la dégradation des liqueurs noires en augmentant le taux d'azote.

Cultures sur milieu à 0,2 ‰ d'azote

Les mêmes souches sont mises en culture sur un milieu renfermant 3 g de glucose par litre ; la concentration en phosphate bibasique d'ammonium atteint 1 g/l correspondant à des teneurs en N de 0,2 ‰ et en P de 0,24 ‰.

Les pH évoluent de façon identique (tableau e). En présence de *Rh. mucilaginosa* (21 c63) et de *Ps. geniculata* (21 b63), la perte de couleur demeure stationnaire. Elle augmente sous l'influence d'*A. liquefaciens* (18 a63) : de 4 % sur le milieu à 0,1 ‰ d'azote (tableau d), elle passe à 12 % sur le milieu à concentration double. La décoloration s'accroît également sous l'action de *Torula* et atteint 84 % de la valeur initiale.

Souches	pH	Coloration à 8 500 Å		Oxydabilité totale	
		mesure	% réduct.	mg d'O_2/l	% réduct.
Témoin	7,80	12,5	0	1 745	0
18 a63 *A. liquefaciens*	5,50	11	12	675	61
18 b63 *Torula sp.*	6,90	2	84	695	60
21 b63 *Ps. geniculata*	4,70	10	20	580	66
21 c63 *Rh. mucilaginosa*	7,05	12	4	760	56

Tableau e : Cultures sur milieu à 0,2 ‰ N et 3 ‰ de glucose

L'oxydabilité des eaux subit une réduction allant de 56 à 66 %, nettement plus forte que dans le cas du milieu précédent.

L'augmentation de la teneur en azote entraîne donc une décoloration importante des eaux et améliore la dégradation des matières organiques.

Le même milieu, mais à 5 g de glucose par litre, sert de base aux cultures des micro-organismes déjà étudiés auxquels s'ajoutent, dans un but de généralisation, ceux isolés des puits 18, 5C, 2D, 3D, 7D, 1E et 2E en 1964 et 1965. Les résultats sont résumés dans le tableau f :

Souches	pH	Coloration à 5 500 Å			Oxydabilité			
		Surnageant		Culot	Totale		Alcali-lignines	
		mesure	%réduct.	mesure	mg d'O_2/l	% réduct.	mg d'O_2/l	% réduct.
Témoin	8,55	89,5	0	0	2 940	0	214	0
1E a64 *Aeromonas sp.*	7,05	83	7	0	1 310	56	260	0
2D a64 *Paracolobactrum aerogenoides*	7,15	84	6	0	1 250	57	253	0
2E a64 *Ps. putida*	7,10	77	14	9	462	84	180	16
5C c64 *Achromobacter sp.*	7,00	79	12	5	1 482	49	210	2
7D b63 *M. freudenreichii*	5,30	74	17	6	2 666	8,5	230	0

Souches	pH	Coloration à 8 500 Å			Oxydabilité			
		Surnageant		Culot	Totale		Alcali-lignines	
		mesure	%réduct.	mesure	mg d'O_2/l	% réduct.	mg d'O_2/l	% réduct.
Témoin	8,05	7	0	0	2 913	0	150	0
21 b63 *Ps. geniculata*	5,25	5	28	2	490	83	130	13
Témoin	7,70	11,5	0	0	2 643	0	238	0
3D e65 *B. pumilus*	7,20	11,5	0	0,5	2 252	15	276	0
18 d65 *M. rhodocrous*	7,60	12	0	0	2 435	8	279	0
18 j65 *Flavobacterium sp.*	7,15	10,5	9	1,5	2 354	11	235	1,3
Témoin	7,30	15,5	0	0	3 104	0	245	0
18 b63 *Torula sp.*	6,70	4,5	71	10	1 341	57	171	30
21 c63 *Rh. mucilaginosa*	7,05	12,5	19	1	2 230	28	230	6
Témoin	8,05	12,5	0	0	2 236	0	238	0
18 a63 *A. liquefaciens*	5,95	11	12	2	644	71	232	3

Tableau f : Cultures sur milieu à 0,2 ‰ N et à 5 ‰ de glucose

Les analyses habituelles de pH, coloration et d'oxydabilité sont complétées par la mesure de l'oxydabilité des alcali-lignines, suivant la méthode décrite au cours de l'exposé des techniques. Elle seule peut révéler une dégradation de la lignine. La détermination de la coloration du culot de centrifugation des cultures traité par la soude à 4 % indiquera s'il y a eu floculation ou ligninolyse. En effet, lorsque la somme des indices de coloration du surnageant et du culot de centrifugation sera inférieure à la valeur du témoin, on pourra considérer qu'il y a eu ligninolyse.

Dans la grande majorité des cas, les pH se maintiennent au voisinage de la neutralité. Seules les souches 21 b63 (*Ps. geniculata*), 18 a63 (*Aeromonas liquefaciens*) et 7D b63 (*Micrococccus freudenreichii*) fortement acidogènes, abaissent la réaction du milieu à des valeurs limites de 5,25-5,30.

Les souches 18 d65 (*Micrococcus rhodocrous*) et 3D e65 (*Bacillus pumilus*) ne présentent pas d'intérêt : elles ne décolorent pas le milieu et utilisent faiblement les matières organiques. On constate même, paradoxalement, l'augmentation de l'oxydabilité des alcali-lignines.

Trois souches : 1E a64 (*Aeromonas sp.*), 2D a64 (*Paracolobactrum aerogenoides*) et 7D b63 (*M. freudenreichii*) entraînent une perte de 6 à 17 % de la coloration initiale sans pour autant réduire la teneur en composés ligneux.

Les autres espèces en culture font décroître la demande chimique en oxygène des alcali-lignines à pH acide ou neutre.

Les souches 18 a63 (*Aeromonas liquefaciens*) et 21 b63 (*Pseudomonas geniculata*) acidifient le milieu et réduisent la teneur en composés ligneux de 3 et 13 % pour une perte de 12 et 28 % de la coloration initiale. Le traitement du culot de centrifugation montre que la totalité de la lignine éliminée peut être redissoute dans la soude. Il ne s'agit donc pas d'une véritable biodégradation mais vraisemblablement d'une floculation en milieu acide.

Les souches 18 b63 (*Torula sp.*), 2E a64 (*Pseudomonas putida*), 21 c63 (*Rhodotorula mucilaginosa*), 5C c64 (*Achromobacter sp.*) et 18 j65 (*Flavobacterium sp.*) dégradent les alcali-lignines à pH neutre. La souche 18 b63 (*Torula sp.*) fournit les meilleurs résultats. Pour une perte très élevée de 71 % de la coloration, la teneur en composés ligneux décroît de 30 % de la valeur initiale avec une consommation très moyenne (57 %) des matières organiques. Là, encore, il ne s'agit pas de ligninolyse réelle : le mycélium présente une coloration brune, visible à l'oeil nu, provenant de lignine fixée, celle-ci peut être éluée presque totalement par le solvant. Le milieu possédant une réaction voisine de la neutralité, on ne peut invoquer un processus de floculation mais sans doute une adsorption au niveau des hyphes. La faible dégradation de la lignine par la souche 18 j65 (*Flavobacterium sp.*) s'explique de façon analogue.

La souche 2E a64 (*Pseudomonas putida*) réduit de 16 % l'oxydabilité des alcali-lignines et provoque une perte de 14 % de la coloration à pH neutre. Une fraction importante de lignine, mais non la totalité, a été

adsorbée par les parois bactériennes. L'examen des souches 5C c64 (*Achromobacter sp.*) et 21 c63 (*Rhodotorula mucilaginosa*) permet d'arriver aux mêmes conclusions, cependant la dégradation est plus faible (2 à 6 %). L'utilisation des matières organiques varie de 28 % (21 c63) à 87 % (2E a64).

L'augmentation de la teneur en glucides se traduit donc, dans l'ensemble, par des pourcentages de perte de coloration plus élevés (excepté *Torula sp.* 18 b63) et une meilleure dégradation des matières organiques. Sept souches modifient l'oxydabilité des composés ligneux, parmi elles : 2E a64, 21 c63 et 5C c64 (*Ps. putida*, *Rh. mucilaginosa* et *Achromobacter sp.*) dégradent réellement mais partiellement les alcali-lignines, 18 b63 et 18 j65 (*Torula sp.* et *Flavobacterium sp.*) les adsorbent sur leurs parois, 18 a63 et 21 b63 (*A. liquefaciens* et *Ps. geniculata*) les font floculer en acidifiant le milieu.

Cultures sur milieu à 2 ‰ d'azote

Les sept souches les plus intéressantes sont cultivées sur le milieu suivant renfermant 2 ‰ d'azote, soit une concentration dix fois supérieure à celle du milieu précédent.

- Eau résiduaire ..... 950 ml
- Solution saline de Winogradsky à 10 g/l de phosphate bipotassique ..... 50 ml
- Nitrate d'ammonium ..... 5,7 g
- Glucose ..... 5 g
- Teneur en azote ..... 2 ‰
  en phosphore ..... 0,12 ‰

Le tableau g résume les résultats de cette expérience :

Souches	pH	Coloration à 8 500 Å		Oxydabilité			
				Totale		Alcali-lignines	
		mesure	%réduct.	mg d'O_2/l	%réduct.	mg d'O_2/l	%réduct.
Témoin	7,75	14	0	2 921	0	239	0
2E a64 *Ps. putida*	5,40	9,5	32	2 773	5	216	9,6
5C c64 *Achromobacter sp.*	6,10	12	14	1 410	52	230	3,7
18 a63 *A. liquefaciens*	5,35	8,5	40	2 311	21	161	32
18 b63 *Torula sp.*	4,25	3	78	1 858	36	51	78
18 j65 *Flavobacterium sp.*	6,90	14	0	2 700	7,6	240	0
21 b63 *Ps. geniculata*	5,40	10	28	2 210	24	220	8
21 c63 *Rh. mucilaginosa*	4,80	7	50	2 316	21	192	19

Tableau g : Cultures sur milieu à 2 ‰ N et 5 ‰ de glucose

Le milieu témoin a un pH de 7,75. Sous l'influence du développement de toutes les souches, exceptée 18 j65 (*Flavobacterium sp.*), une forte acidification se manifeste. Les valeurs les plus basses sont observées sous l'action de 18 b63 (*Torula sp.*) et de 21 c63 (*Rh. mucilaginosa*) (4,25-4,80).

Du point de vue coloration, 18 j65 ne provoque aucun changement, par contre 18 b63 entraîne une perte maximum de 78 % de la coloration d'origine. Les autres résultats s'étalent entre 14 et 50 % et l'on constate que la décoloration varie proportionnellement à l'acidification du milieu.

L'évolution de l'oxydabilité des alcali-lignines reflète fidèlement celle de la coloration. De 239 mg d'O_2/l pour le témoin, la demande chimique en oxygène décroît de 78 % sous l'action de 18 b63 (*Torula sp.*),de 32% dans les cultures de 18 a63 (*A. liquefaciens*) et de 19 % avec 21 c63 (*Rh.mucilaginosa*).

Les souches 21 b63 (*Ps. geniculata*) et 2E a64 (*Ps. putida*), appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*, se révèlent moins actives déterminant seulement une perte de 8 à 10 %.

L'action du pH paraît primordiale sur la réduction des composés ligneux et confirme la notion de floculation et de précipitation. Les microorganismes, au cours de leur croissance, ne consomment qu'une faible fraction des matières organiques en solution, notamment 2E a64 et 18 j65 (de 5 à 8 %). En moyenne, l'oxydabilité diminue de 21 à 36 % de la valeur d'origine, seul 5C c64 présente une utilisation supérieure (52 %).

L'augmentation de la teneur en azote accroît les pourcentages de décoloration et de réduction de l'oxydabilité alcali-lignines par acidification plus élevée du milieu.

Le même lot de souches à l'exclusion de 18 j65 subit dans le même milieu une aération artificielle (tableau h) :

Souches	pH	Coloration à 5 500 Å			Oxydabilité			
		Surnageant		Culot	Totale		Alcali-lignines	
		mesure	%réduct.	mesure	mg d'O_2/l	% réduct.	mg d'O_2/l	%réduct.
Témoin	7,20	57	0	0	3 151	0	280	0
2E a64 *Ps. putida*	3,95	5	91,2	40	2 005	36,4	0	100
5C c64 *Achromobacter sp.*	5,55	21	63,1	30	953	69,7	210	25
18 a63 *A. liquefaciens*	4,00	15	73,7	36	1 684	46,6	17,5	94
18 b63 *Torula sp.*	4,10	10	82,4	44	1 923	39	35,5	87
21 b63 *Ps. geniculata*	4,95	21	63,1	32	2 016	36	187	33
21 c63 *Rh.mucilaginosa*	3,00	6	89,4	50	1 636	48,1	0	100

Tableau h : Cultures aérées sur milieu à 2 ‰ N et 5 ‰ de glucose

L'ensemble des souches acidifie le milieu de façon nettement plus marquée, l'échelle des valeurs s'étend de pH 3,00 sous l'action de 21 c63 (*Rh. mucilaginosa*) à 5,55 en présence de 5C c64 (*Achromobacter sp.*).

Le développement des micro-organismes se traduit par un éclaircissement très prononcé de la teinte. La décoloration atteint 90 % de la valeur initiale au contact des souches 2E a64 (*Ps. putida*) et 21 c63 (*Rh. mucilaginosa*) ; elle reste très élevée, de 63 à 82 %, pour les autres cultures. Il s'ensuit une réduction intense de l'oxydabilité des alcali-lignines : totale sous l'action de 2E a64 et de 21 c63, de 94 % en présence de 18 a63 (*A. liquefaciens*) et de 87 % avec 18 b63 (*Torula sp.*). L'analyse colorimétrique du culot de centrifugation montre que pour tous les germes, sauf 2E a64 (*Ps.putida*), il y a eu floculation par acidification. Pour cette dernière souche, la disparition de la lignine ne semble pas dépendre uniquement d'un phénomène physico-chimique. Les colorations, additionnées, du surnageant et du culot, ne redonnent pas, en tenant compte des erreurs possibles de mesures, la teinte du témoin.

Comparée aux résultats des cultures non aérées, l'utilisation des matières organiques apparaît supérieure. Les pourcentages de dégradation oscillent entre 36 et 48 avec un maximum voisin de 70 au contact de 5C c64 (*Achromobacter sp.*).

La réduction du taux d'oxydabilité alcali-lignines le plus élevé s'obtient sur milieu aéré, à 2 ‰, d'azote et en présence de glucose.L'acidification intense rend difficile la dissociation des processus physico-chimiques des phénomènes microbiologiques de dégradation. Seul, l'emploi de substances limitant les variations de pH peut permettre cette distinction.

b) Milieux tamponnés

Dans le but de stabiliser la réaction du milieu, deux solutions peuvent être préconisées :

- l'emploi de carbonate de calcium neutralisant progressivement l'acidité formée.

- l'utilisation de solutions tampons à base de phosphates, selon les formules classiques établies par SORENSEN.

Stabilisation du pH par le carbonate de calcium

Lors de la répartition du milieu, de composition identique au précédent, on ajoute, par fiole d'Erlenmeyer, 1 g de carbonate de calcium en poudre. Les souches acidogènes, 21 c63 (*Rh. mucilaginosa*), 21 b63 (*Ps. geniculata*) et 18 a63 (*A. liquefaciens*) servent de matériel d'expérience et donnent les résultats suivants (tableau i) :

Souches	pH	Coloration à 5 500 Å		Oxydabilité			
				Totale		Alcali-lignines	
		mesure	%réduct.	mg d'O /l	% réduct.	mg d'O /l	%réduct.
Témoin sans Ca^{++}	7,95	66,5	0	3 064	0	137	0
Témoin avec Ca^{++}	7,90	25	62	2 950	3,7	80	42
18 a63 *A. liquefaciens*	8,15	4,5	94	557	82	8	94
21 b63 *Ps. geniculata*	7,85	21	68	877	71	73	47
21 c63 *Rh. mucilaginosa*	7,85	18,5	72	2 606	15	68	50

Tableau I : Utilisation du carbonate de calcium pour neutraliser l'acidité du milieu.

Le carbonate de calcium neutralise parfaitement les acides organiques produits au cours de l'incubation : les valeurs s'éloignent, tout au plus, de 0,2 unité par rapport à celle du témoin.

Les liqueurs noires se décolorent fortement de 68 à 94 % entraînant une réduction d'oxydabilité des alcali-lignines de 47 à 94 %.

Un milieu témoin, en présence de calcium, conduit aux mêmes résultats.

La floculation de la lignine intervient donc en présence des ions Ca^{++} et ce mode de neutralisation ne peut être retenu.

Emploi de solution tampons phosphate

Le mélange de 700 ml d'une solution de phosphate disodique 1/15 mol/l (11,876 g/l de $PO_4 HNa_2, 2H_2O$ dans l'eau bidistillée) et de 300 ml d'une solution de phosphate monopotassique 1/15 mol/l (9,078 g/l de PO_4H_2K dans l'eau bidistillée) fournit une solution tampon de pH 7,17.

Pour obtenir un pH de cet ordre, en utilisant de l'eau résiduaire,, il suffira de dissoudre, par litre, 8,3 g de phosphate disodique et 2,7 g de phosphate monopotassique.

Cette teneur en phosphates paraissant trop élevée,nous avons utilisé le tampon dilué au 2/3 et le milieu se compose de :

- Eau résiduaire ..... 1 000 ml
- Nitrate d'ammonium ..... 5,7 g
- Phosphate monopotassique ..... 1,8 g
- Phosphate disodique ..... 5,6 g

- Teneur en azote ..... 2 ‰
  en phosphore ... 1,2 ‰

;

La source de glucose est stérilisée séparément sous forme de solution aqueuse concentrée puis ajoutée aseptiquement au moment de l'emploi à la concentration de 5 g par litre.

Les mêmes souches 18 a63 (*A. liquefaciens*), 21 b63 (*Ps. geniculata*), 21 c63 (*Rh. mucilaginosa*) servent pour l'analyse (tableau j) :

Souches	pH	Coloration à 5 500 Å			Oxydabilité			
		Surnageant		Culot	Totale		Alcali-lignines	
		mesure	%réduct.	mesure	mg d'O_2/l	%réduct.	mg d'O_2/l	%réduct.
Témoin	6,95	54	0	0	2 767	0	310	0
18 a63 *A. liquefaciens*	6,65	47	13	5	1 207	56,4	298	3,9
21 b63 *Ps. geniculata*	6,95	49	9,2	5	1 027	62,9	294	5,2
21 c63 *Rh.mucilaginosa*	6,75	51	5,5	7	2 300	16,9	301	2,9

Tableau j : Utilisation du tampon phosphates

Les pH se maintiennent proches de la valeur du témoin ; l'écart maximum ne dépasse pas 0,3 unité. Sous l'influence du développement des trois souches, la perte de coloration oscille entre 5,5 % (21 c63) et 13 % (18 a63). A ces faibles décolorations correspondent de légères réductions de l'oxydabilité lignine.

L'emploi de ce tampon phosphates donne entière satisfaction. L'ensemble complet des souches isolées du terrain d'épandage est mis sur milieu à 2 ‰ d'azote, tamponné et aéré.

2 - Action des souches en culture pure

Afin de permettre une meilleure adaptation aux liqueurs noires, les micro-organismes sont cultivés successivement sur des milieux à 2 ‰

d'azote, tamponnés et aérés mais à teneur décroissante en glucose.L'expérience d'une durée de 66 jours, se déroule de la façon suivante. Chacune des souches étudiées, après préculture sur milieu liquide pendant 48 heures à la température de 28°C, est ensemencée sur un milieu contenant 5 g de glucose par litre puis incubée pendant 7 jours à la même température. On transfère ensuite 0,5 ml de la culture obtenue sur un nouveau milieu glucosé seulement à 2,5 ‰, le développement dure également sept jours. On procède ensuite à la même opération sur des milieux à 1 g par litre puis sans glucose. Sur ce dernier, le temps de culture est porté à 45 jours. A l'occasion de chaque repiquage et en fin d'expérience, les caractéristiques physico-chimiques des milieux de culture sont déterminées par les procédés habituels et comparées à cellesd'un témoin.

a) Rôle du glucose dans les phénomènes de biodégradation

Les tableaux n°s17 à 23 résument l'ensemble des résultats. Sous l'influence du développement des micro-organismes, les pH subissent peu de modifications. Etant donné la présence de tampon phosphates, les valeurs ne diffèrent, au maximum, que d'une unité : la floculation par acidification du milieu ne peut donc se produire.

Cultures sur milieu à 5 ‰ de glucose (tableaux n°s 17 et 18)

En comparant les colorations des différentes cultures et l'oxydabilité des alcali-lignines, on remarque que les souches peuvent être classées en trois catégories suivant le mode d'attaque des liqueurs noires :

Les treize souches suivantes : 18 c63 (*Micrococcus luteus*), 18 d63 (*Brevibacterium sp.*), 18 e63 (*Achromobacter sp.*), 18 d64 (*Brevibacterium sp.*), 5C d64 (*Acinetobacter candicans*), 2D a64 (*Paracolobactrum aerogenoides*), 18 g65 (*Micrococcus sp.*), 18 j65 (*Flavobacterium sp.*), 3D d65 (*Achromobacter iophagus*), 3E a65 (*Achromobacter sp.*), 7B a67 (*Bacillus subtilis*), 7B b67 (*Empedobacter sp.*) et 7B c67 (*B. cereus*) ne provoquent aucune décoloration appréciable et n'abaissent pas la teneur en alcali-lignines. Seule la demande chimique totale en oxygène diminue par suite de l'assimilation de la substance énergétique.En culture pure, ces souches ne possèdent pas la faculté de dégrader les substances fortement biorésistantes contenues dans les eaux résiduaires. Leur étude ne sera donc pas poursuivie mais nous n'excluons pas cependant qu'elles puissent jouer un rôle dans le sol, milieu naturel complexe, siège d'associations et d'antagonismes entre les différents micro-organismes qui le peuplent.

Dix-huit souches dégradent partiellement les composés ligneux mais ne clarifient pas les liqueurs noires, bien au contraire, certaines entraînent une élévation de coloration.

Les espèces 18 b64 (*Pseudomonas oleovorans*), 3C a64 (*Micrococcus candidus*) et 3E b65 (*Bacterium sp.*) provoquent une perte maximum d'oxydabilité

des alcali-lignines de 23,6 % de la valeur du témoin tandis que l'utilisation des matières organiques varie de 16,5 à 68 %. Parmi ces micro-organismes figure *Pseudomonas oleovorans* (18 b64) dont l'espèce type décrite fut isolée de sols imprégnés d'huile minérale.

La souche 3C a64 (*Micrococcus candidus*), isolée à 260 mètres du lieu de l'infiltration surcolore nettement le milieu par rapport aux deux autres espèces et n'assimile que faiblement les substances facilement biodégradables.

Les micro-organismes 18 c67 (*Bacillus megaterium*), 1E a64 (*Aeromonas sp.*) et 1E b64 (*Sarcina lutea*) se montrent moins actifs puisque la dégradation des alcali-lignines ne varie seulement qu'entre 11 et 13 %.Les douze autres espèces offrent moins d'intérêt : les pourcentages de dégradation restent faibles (2 à 7 %).

Onze souches décolorent le milieu et réduisent la teneur en composés ligneux. Parmi celles-ci, seules 2E a64 (*Ps. putida*), 18 f65 (*Empedobacter dormitator*) et 18 a67 (*Acinetobacter viscolactis*) semblent dégrader réellement la lignine : la somme des indices de coloration du surnageant et du culot de centrifugation est inférieure à la valeur du témoin.

L'espèce 2E a64 (*Ps. putida*) provoque une perte de 39,6 % de la coloration et abaisse la demande chimique en oxygène des alcali-lignines de 89 % tandis que la teneur en matières organiques diminue de 44,7 %.

La souche 18 f65 (*E. dormitator*) décolore encore plus fortement le milieu (47,5 %) mais donne, du point de vue ligninolyse, des résultats légèrement inférieurs (76,4 % de dégradation).

Enfin, le développement de 18 a67 (*A. viscolactis*) entraîne une perte de 11,3 % de la couleur et une réduction de 31,6 % des composés ligneux.

Ces trois souches : *Pseudomonas putida, Empedobacter dormitator* et *Acinetobacter viscolactis* appartiennent à la famille des *Pseudomonadaceae*.

Les autres micro-organismes ne semblent pas dégrader les lignines mais possèdent la faculté de les adsorber partiellement sur leurs parois. On peut citer, parmi les résultats les plus significatifs, l'action des souches 18 b63 (*Torula sp.*), 18 h65 (*Nocardia corallina*) et 5C c64 (*Achromobacter sp.*) qui abaissent de 30 à 35 % la teneur en alcali-lignines.

L'attaque microbienne des composés ligneux, en présence de substances facilement assimilables, peut, en résumé, s'effectuer de trois façons:

- par oxydation avec production de substances colorées, comparable aux processus d'humification.
- par dégradation réelle entraînant la décoloration du milieu

- par adsorption, à pH neutre, sur les parois microbiennes provoquant également la décoloration des liqueurs noires mais la totalité de la lignine adsorbée peut être dissoute par une solution de soude à 4 % et mesurée colorimétriquement.

Cultures sur milieu à 2,5 ‰ de glucose (tableaux nºs 19 et 20)

L'abaissement de la teneur en glucose à 2,5 ‰ entraîne parmi les 29 souches en culture, la perte du pouvoir épurateur vis-à-vis des composés ligneux de six espèces : 1E a64 (*Aeromonas sp.*), 1E b64 (*Sarcina lutea*), 3D f65 (*Microcyclus aquaticus*), 3E b65 (*Bacterium sp.*), 18 c67 (*Bacillus megaterium*) et 18 a63 (*A. liquefaciens*) dont la plupart, sur le milieu précédent, provoquait une augmentation de coloration. Celle-ci n'est désormais plus constatée.

Dix espèces, au contraire, altèrent plus profondément les alcali-lignines. Le développement de 21 b63 (*Pseudomonas geniculata*), 18 b63 (*Torula sp.*), 18 h67 (*Brevibacterium sp.*), 2E a67 (*B. cereus* var. *mycoides*) et 3D b65 (*Micrococcus varians*), entraîne une perte de coloration et de matières organiques supérieure à celle obtenue en présence d'une concentration en glucides de 5 ‰. L'adsorption prédomine sur la ligninolyse réelle. Cette dernière s'observe surtout sous l'influence du développement de 3D b65 (*Micrococcus varians*). Ce micro-organisme abaisse de 94,4 % la teneur en composés ligneux et provoque une perte de 82 % de la couleur. La fraction la plus importante de lignine éliminée, mais non la totalité, peut être extraite dans le culot de centrifugation des cultures.

La souche 18 c64 (*Rh. mucilaginosa*) assimile mieux les matières organiques présentes sans accroître la décoloration du milieu tandis que les espèces 7B f67 (*Bacillus sp.*) et 18 d65 (*Micrococcus rhodocrous*) produisent le phénomène inverse. 18 a67 (*A. viscolactis*) réduit fortement la teneur en matières organiques et en alcali-lignines mais a peu d'influence sur la couleur.

Les micro-organismes suivants : 7D b63 (*M. freudenreichii*),2E a64 (*Ps. putida*), 18 c65 (*Brevibacterium sp.*), 18 e65 (Actinomycète) et 3D e65 (*B. pumilus*) fournissent des pourcentages de réduction de l'oxydabilité des composés ligneux analogues à ceux obtenus sur le milieu précédent. La souche 2E a64 (*Ps. putida*) est surtout à retenir avec une diminution de 85,9 % de la teneur en alcali-lignines. On remarque, également, que la décoloration du milieu et la perte en matières organiques s'accroissent.

Enfin, les huit derniers micro-organismes en culture attaquent plus faiblement les constituants des liqueurs noires sur ce milieu ; cette baisse d'activité s'accompagne d'une utilisation réduite des matières organiques.

Cultures sur milieu à 1 ‰ de glucose (tableau n° 21)

Douze souches seulement se développent et, dans l'ensemble, les processus de délignification perdent de leur intensité.

Les espèces indexées 5C c64 (*Achromobacter sp.*),3D b65 (*M.varians*), 2E b67 (*M. flavus*) et 18 h67 (*Brevibacterium sp.*) ne modifient plus l'oxydabilité des alcali-lignines malgré une légère perte de coloration.Ce fait paraît surprenant pour l'espèce 3D b65 (*M. varians*) qui, précédemment, se révélait très active.

Le développement des souches 2E a64 (*Ps. putida*) et 18 a67 (*A.viscolactis*) n'entraîne plus,respectivement, qu'une perte de coloration de 26 et de 5 %. Il s'ensuit que la dégradation des composés ligneux diminue et passe à 18 % pour 2E a64 et à 13,3 % pour 18 a67. On remarque également que l'utilisation des matières organiques décroît.

Les souches 18 f65 (*E. dormitator*), 18 h65 (*N. corallina*)et 21 b63 (*Ps. geniculata*) présentent un pourcentage de dégradation des alcali-lignines stationnaire mais une plus faible utilisation des matières organiques.

En présence de la souche fongique 18 b63 (*Torula sp.*), la perte de lignine s'accroît et dépasse 54 % tandis que la décoloration du milieu et la réduction des substances oxydables sont plus faibles.On constate,cependant, qu'une partie des composés ligneux a été dégradée.

Au total, en présence de glucose à 1 ‰, huit souches conservent la faculté de dégrader les liqueurs noires.

b) Cultures en absence de glucose (tableaux nºs 22 et 23)

Les matières organiques sont apportées uniquement par les eaux résiduaires. On remarque d'abord que la souche 18 c64 (*Rh. mucilaginosa*) ne modifie plus, après 45 jours de culture, l'oxydabilité des alcali-lignines et demeure pratiquement sans action sur la coloration.

L'analyse des cultures des sept autres micro-organismes indique, à l'exception de l'espèce 18 i65 (*Nocardia sp.*) une baisse de dégradation des composés ligneux.

L'attaque la plus importante est notée en présence de la souche 2E a64 (*Pseudomonas putida*) avec une réduction de 16,8 % de lignine s'accompagnant d'une perte de 24,4 % de la coloration du témoin. L'examen du culot de centrifugation semble prouver qu'une fraction de lignine est réellement dégradée.

Par adsorption, la teneur en alcali-lignines est réduite de 8 % sous l'influence de 18 f65 (*Empedobacter dormitator*) ; de 5,4 % en présence de 18 h65 (*Nocardia corallina*) et de 3,3 % sous l'effet de 21 b63 (*Pseudomonas geniculata*).

Les espèces 18 i65 (*Nocardia sp.*) et 18 a67 (*Acinetobacter viscolactis*) abaissent la teneur en composés ligneux sans provoquer de décoloration appréciable.

Le développement de la souche 18 b63 (*Torula sp.*) entraîne une perte de 39 % de la coloration et de 7,5 % de lignine. Cette dernière est en presque totalité adsorbée.

Les sept souches actives en absence de glucose ont été cultivées, en outre, pendant 45 jours sur un milieu semblable au précédent mais dont les alcali-lignines extraites de liqueurs noires du lessiveur puis redissoutes constituent la seule source de carbone (tableau n° 23). On constate alors que la dégradation des composés ligneux est très faible, au maximum de 3 %.L'élimination des substances facilement biodégradables contenues dans les eaux résiduaires entrave considérablement le développement des micro-organismes adaptés.

L'abaissement progressif de la teneur en glucose se traduit donc par une diminution du nombre d'espèces réduisant la teneur en alcali-lignines et s'accompagne généralement d'un pourcentage de dégradation de plus en plus faible. Au terme de l'expérience, sur l'ensemble des souches isolées du terrain, sept seulement possèdent la propriété de dégrader les eaux résiduaires, en l'absence de glucose. Il s'agit de *Pseudomonas putida, Nocardia sp., Empedobacter dormitator, Torula sp., Nocardia corallina, Ps. geniculata* et *Acinetobacter viscolactis*.

La figure 34 représente les variations de la perte d'oxydabilité des alcali-lignines en fonction de la teneur en glucose du milieu de culture. On remarque que *Torula sp.* présente une dégradation maximum au contact de glucose à 1 ‰ tandis que *Pseudomonas geniculata* ne marque une baisse de rendement qu'en absence de glucose. Les cinq autres souches fournissent les meilleurs résultats en présence d'une teneur élevée en glucides. On doit donc admettre que les lignines sont surtout dégradées lorsque le milieu renferme encore une forte proportion de substances facilement biodégradables.

Les numérations effectuées en milieu liquide, au début de l'expérience et toutes les semaines,renseignent sur le développement des micro-organismes et permettent d'établir les courbes de croissance pour chaque espèce; elles sont représentées sur la figure 35, le nombre de germes étant exprimé en logarithmes.

Acinetobacter viscolactis prolifère le plus activement : initialement, de 2,5 millions de germes par ml de milieu de culture, la population bactérienne atteint 130 millions après 7 jours d'incubation. La croissance se poursuit pendant 28 jours avec une population maximum de 500 millions de germes par ml. En fin d'expérience (35 jours de culture), les évaluations sont de l'ordre de 35 millions par ml.

Pseudomonas putida et *Ps. geniculata* présentent des courbes de croissance analogues avec une phase de croissance très courte, d'environ sept jours, puis le nombre de micro-organismes décroît progressivement.

*Torula sp.*et *Nocardia sp.* se développent pendant 14 jours puis la micropopulation diminue fortement.

Empedobacter dormitator prolifère pendant sept jours de 500 000 germes par ml, la microflore s'élève à 70 millions.

Quant à *Nocardia corallina*, la croissance n'a pas lieu mais les micro-organismes se maintiennent en vie durant toute l'expérience.

3 - Action des souches en association

Afin d'accroître le rendement de la biodégradation des alcali-lignines, les souches ont été cultivées en association à l'aide d'ensemencements simultanés ou successifs.

a) Ensemencements simultanés

Les souches dégradant les alcali-lignines en absence de glucose ont été associées par deux, c'est-à-dire qu'au début de l'expérience, l'ensemencement est fourni par 0,5 ml de suspension microbienne de deux espèces différentes. Les 21 combinaisons obtenues sont cultivées pendant 35 jours sur un milieu de composition identique au précédent. Les résultats sont résumés dans le tableau n° 24.

On remarque d'abord que, sous l'influence de l'association *Pseudomonas geniculata-Empedobacter dormitator*, la perte en alcali-lignine atteint 33,3 %, pourcentage jamais obtenu par aucune des souches en culture pure. La perte de coloration de 32 % est malgré tout inférieure à celle engendrée par *Torula sp.*

Une fraction assez importante de lignine semble avoir été réellement dégradée alors que les deux espèces, cultivées isolément, épurent les liqueurs noires uniquement par un processus d'adsorption.

Les associations réalisées avec *Torula sp.* ne semblent pas bénéfiques : la perte de coloration décroît, elle demeure toujours inférieure à celle produite par *Torula sp.* La dégradation des composés ligneux diminue fortement pour être nulle dans les mélanges suivants : *Ps. geniculata-Torula sp.* , *Torula sp.- Ps. putida, Torula sp.-N. corallina.* Une seule exception est à signaler pour l'association avec *Acinetobacter viscolactis* qui abaisse la teneur en alcali-lignines de 8,4 % alors que ces deux souches en culture pure entraînent une perte maximum de 7,5 % (*Torula sp.*). Le développement s'accompagne d'une perte de 31 % de la coloration du témoin. On constate également qu'une fraction de lignine éliminée semble réellement dégradée tandis qu'en cultures pures, il n'y avait uniquement qu'adsorption.

Les associations avec *Acinetobacter viscolactis* provoquent dans la plupart des cas une perte de coloration plus importante que celle obtenue par chacune des souches isolées, exceptions faites de *Ps. geniculata* et de *Torula sp.* Mais cette décoloration plus accentuée n'a pas de répercussion sur

la réduction de la demande chimique en oxygène des alcali-lignines. Seul le couple *Torula sp.-A. viscolactis*, déjà signalé, présente un intérêt certain.

Les mélanges obtenus à partir de *Ps. putida*, caractérisé par une assimilation partielle mais réelle des composés ligneux,n'apportent aucune amélioration. Au contraire, on remarque que le couple *Ps. geniculata-Ps. putida* dégrade les composés ligneux uniquement par adsorption.

Les associations renfermant *N. corallina* ou *Nocardia sp.* ne présentent pratiquement pas d'intérêt.

b) Ensemencements successifs.

Dans le terrain d'épandage, les eaux résiduaires subissent une épuration par actions successives des micro-organismes. Nous avons tenté de reproduire expérimentalement ces conditions naturelles en utilisant les sept souches aptes à dégrader les alcali-lignines.

Les cinq espèces suivantes : *Acinetobacter viscolactis*, *Empedobacter dormitator*, *Nocardia corallina*, *Nocardia sp.* et *Torula sp.*, toutes isolées dans les eaux du puits 18 à proximité de l'épandage, ont été mises en culture aérée les premières, soit isolément, soit associées par deux et par trois, sur le milieu habituel dépourvu de glucose. On obtient, au total, 25 combinaisons différentes. Après sept jours d'incubation à la température de 28°C, on ajoute, dans chaque culture, 0,5 ml d'une suspension de *Pseudomonas geniculata*, micro-organisme isolé à 100 m du lieu de l' infiltration et au 21ème jour de culture, dans les mêmes conditions, 0,5 ml d'une suspension de *Pseudomonas putida*, isolé à 420 m de l'épandage. Après 35 jours de développement, on procède à l'analyse physico-chimique de chaque culture ; les résultats sont consignés dans les tableaux n^{os} 25 et 26.

Toutes les associations comprenant *Torula sp.* provoquent une dégradation des alcali-lignines inférieure à celle observée sous l'action isolée de *Pseudomonas putida*. Elles ne seront donc pas à retenir. Cependant, on peut remarquer que les meilleurs résultats s'obtiennent en présence de *Nocardia corallina* (11,1 %) et du couple *N. corallina-E. dormitator*.

Les différentes combinaisons réalisées à partir d'*Acinetobacter viscolactis* mettent en évidence l'action favorable d'*Empedobacter dormitator*. La perte de coloration atteint 33,3 % de la valeur du témoin et correspond à une réduction de 14,9 % de la teneur en alcali-lignines. Mais ce n'est qu'au contact de l'association *Nocardia sp.-E.dormitator-A.viscolactis* que l'on note une amélioration de la dégradation des composés ligneux (18,2 %), la perte de couleur étant de 26,6 %.

En présence de *Nocardia corallina*, la décoloration du milieu et l'attaque de la lignine sont sensiblement analogues à celles provoquées par *Ps. putida*. L'association de *N. corallina* avec *E. dormitator* accroît à 21,8 le pourcentage de réduction de l'oxydabilité des alcali-lignines pour une

perte de coloration de seulement 13,3 %. L'association du couple *N.corallina-E. dormitator* avec les autres souches fournit des résultats inférieurs.

Les associations réalisées avec *Nocardia sp.* montrent que, sous l'influence d'*E. dormitator*, l'oxydabilité des alcali-lignines diminue de 17,8 % et le milieu de culture perd 13,3 % de sa coloration. La dégradation des composés ligneux s'accroît et atteint 18,2 % dans les combinaisons suivantes : *N. corallina-Nocardia sp.-E. dormitator* et *Nocardia sp.-E. dormitator-A. viscolactis*, tandis que la décoloration s'accentue.

Enfin, à partir des cultures renfermant *E. dormitator*, on peut signaler l'action favorable de *N. corallina* et de *Nocardia sp.*, souches employées séparément ou en mélange.

L'ensemble de toutes ces associations dégrade donc plus faiblement les alcali-lignines que la combinaison *Ps. geniculata-E. dormitator*.On remarque également que la perte de coloration du milieu ne varie pas proportionnellement à la réduction de la teneur en composés ligneux.

C - DISCUSSION DES RESULTATS

Les liqueurs noires, et en particulier les alcali-lignines,peuvent être dégradées sous l'influence de micro-organismes. L'analyse des résultats de la demande chimique en oxygène des alcali-lignines indique que cette bio-dégradation relève de processus aérobies, fortement influencés par des teneurs élevées en carbone organique et en azote.

En présence de glucose et sur milieu non tamponné, les espèces glucidolytiques acidifient le milieu de culture et provoquent la floculation des composés ligneux, colloïdes électronégatifs et leur adsorption éventuelle sur les parois microbiennes. On constate également que l'adsorption peut s'effectuer à pH neutre. L'adsorption de la lignine à la surface du mycelium des champignons et sur les parois bactériennes est connue depuis les travaux de GOTTLIEB et PELCZAR (1951)(103) et de RAYNAUD (188). SUNDMAN et ses collaborateurs (221) ont montré, en 1968, que la lignine n'était pas liée enzymatiquement à la bactérie. Selon ces auteurs, l'adsorption, favorisée par une réaction acide du milieu, peut s'expliquer par une combinaison chimique entre les groupements acides de la lignine et les constituants basiques des protéines bactériennes amphotères.

Sur milieu tamponné, la dégradation des composés ligneux décroît lorsque la teneur en glucides diminue ce qui revient à admettre que l'attaque des alcali-lignines se produit lorsque le milieu renferme encore des substances facilement assimilables.

En absence de glucose, après 45 jours d'incubation, sept souches en culture pure réduisent l'oxydabilité des composés ligneux. Il s'agit, par

ordre d'importance de *Pseudomonas putida* (16,8 %), *Nocardia sp.* (10,8 %), *Empedobacter dormitator* (8,1 %), *Torula sp.* (7,5 %), *Nocardia corallina* (5,4 %), *Pseudomonas geniculata* (3,3 %) et *Acinetobacter viscolactis* (1,9 %), il semble que la ligninolyse véritable se produise sous l'effet du développement de *Ps. putida*.

La culture d'associations de souches s'avère peu bénéfique sauf dans le cas du mélange *Ps. geniculata-Empedobacter dormitator* qui entraîne la dégradation de 33,3 % des alcali-lignines présentes.

Enfin, au cours de ces expériences, il est apparu que l'indice de coloration ne constituait pas un critère valable de l'appréciation quantitative de la biodégradation des liqueurs noires.

SYNTHESE DES RESULTATS ET CONCLUSIONS GENERALES

La fabrication de la pâte à papier consiste, quel que soit le procédé employé, à libérer les fibres cellulosiques du ciment ligneux qui les incruste et à les laver abondamment afin d'éliminer toutes les substances ligno-tanriques solubilisées. L'ensemble de ces opérations exige l'utilisation de volumes considérables d'eau et aboutit au rejet de "liqueurs noires" non valorisables (eaux résiduaires), composées de matières en suspension, facilement décantables et de matières organiques et minérales en solution. La lignine et les composés organiques d'origine végétale leur confèrent, outre une coloration brune caractéristique, des demandes chimique et biochimique en oxygène plus ou moins élevées (D.C.O. et D.B.O.). La présence de sels minéraux, attribuable en grande partie au procédé de fabrication employé, rend les eaux résiduaires de papeterie Kraft très alcalines.Les liqueurs noires doivent subir une épuration préalable sous peine de provoquer de graves perturbations dans l'équilibre biologique des cours d'eau récepteurs. Le sol sableux des Landes de Gascogne possède une forte perméabilité et constitue, grâce à sa porosité, un milieu naturel propice à l'infiltration et aux activités microbiennes. L'ensemble de ces facteurs, liés aux commodités techniques de réalisation et d'exploitation, a permis d'envisager favorablement l'épandage des liqueurs noires, leur épuration au cours de l'infiltration dans le sol et leur élimination par drainage naturel.

Créée en 1959, la station de traitement des eaux résiduaires comportait, après quelques modifications de mise au point, 7 canaux d'infiltration, parallèles, distants de 15 mètres, de 500 m de longueur, 4 m de largeur et de 2,5 m de profondeur, destinés à recevoir les eaux résiduaires.Ce dispositif subit, en 1964, une profonde transformation. Afin de faciliter l'entretien et de réduire les frais d'exploitation, les canaux d'infiltration furent convertis en deux bassins de 1 m de profondeur totalisant une superficie de 5 hectares soit une capacité utile de 50 000 m3 : c'est ce dispositif qui est actuellement en service.

Cette pratique de rejet sur de vastes superficies demande une surveillance étroite et constante des nappes d'eaux souterraines. Dans ce

but, trente-six puits, destinés à l'examen périodique des liquides du sol, ont été forés dans toutes les directions à partir du lieu de l'infiltration. L'analyse des cinq paramètres suivants : pH, couleur, oxydabilité, azote total et sodium, a permis, d'une part, de suivre le cheminement de l'effluent au sein du sol et, d'autre part, d'apprécier son degré d'épuration.

L'étude microbiologique, quantitative et qualitative, complétant les observations physico-chimiques, a renseigné, de façon directe, sur l'activité microbienne dans les eaux infiltrées. Les différentes souches isolées ont, ensuite, été cultivées sur des milieux à base d'eaux résiduaires afin de déterminer leur capacité de dégrader les alcali-lignines.

A l'état brut, les liqueurs noires de papeterie ne constituent pas un milieu biologique convenable : le pH élevé, de l'ordre de 9,5 à 10, est défavorable au développement des micro-organismes et les procédés classiques d'épuration ne peuvent pas s'appliquer. En s'infiltrant dans le sol, les caractéristiques physico-chimiques de l'effluent se modifient. En premier lieu, les liqueurs noires subissent une neutralisation rapide qui persiste encore après plus de 11 années de fonctionnement. L'abaissement de pH se produit à proximité de l'épandage après une infiltration sur une faible distance de l'ordre de vingt mètres. Ensuite, dans l'ensemble du terrain, les valeurs diminuent légèrement et se rapprochent de celles des eaux naturelles qui ont un pH acide. De nombreux facteurs interviennent dans l'acidification : l'influence du sol s'avère primordiale. On a constaté, en utilisant un dispositif expérimental d'infiltration reconstituant les différents horizons du sol, que le pouvoir tampon très faible et pratiquement nul dans le sable s'alève dans la terre arable mais son action ne dure pas. Les éléments siliceux possèdent, cependant, une légère action acidifiante. La capacité totale d'échange maximum se rencontre dans les horizons illuviaux, véritable complexe absorbant de ce sol. La proportion de matière organique et surtout le degré d'humification augmente le pouvoir tampon du sol. Le faible pouvoir tampon des liqueurs noires, l'aération accrue au cours des échanges gazeux avec l'atmosphère, à dater de la création des bassins, et les précipitations atmosphériques constituent autant de facteurs qui concourent à la neutralisation des eaux résiduaires.

L'obstacle majeur à la mise en oeuvre d'une épuration biologique n'existe donc plus. Il convenait également d'envisager les conséquences d'un apport constant d'ions sodium dans ces sols, des phénomènes de toxicité étant à craindre. Les résultats des dosages ont permis de montrer que les sels de sodium, en grande partie sous forme de sulfate, ne s'accumulaient pas dans le terrain. Comparée à celle de l'effluent, la teneur en sodium ne subit que de faibles variations et ne peut, en aucune façon, entraver les processus d'épuration. Les sels de sodium doivent être éliminés par drainage naturel tout en subissant une réduction active comme ils le sont dans les sols salés auxquels on adjoint du sulfate de calcium. Les analyses microbiologiques ont montré, en effet, la présence dans les eaux infiltrées, d'une population microbienne très active se composant de micro-organismes aérobies numériquement les plus nombreux et de bactéries anaérobies chimio-synthétiques sulfato-réductrices. La microflore sulfato-réductrice, très spécialisée, réalise l'épuration partielle des sels minéraux contenus dans les liqueurs noires.

A partir du lieu de l'infiltration, les eaux résiduaires en cours d'épuration cheminent suivant deux directions principales déterminées par la hauteur d'eau de la rivière : l'une orientée Sud-Ouest/Nord-Est vers l'Eyre représente la pente naturelle du sol, l'autre en direction Nord n'est empruntée que pendant les périodes de grandes pluies, la rivière alimentant la nappe phréatique. L'importance de la micropopulation aérobie évolue non seulement dans le temps mais également selon la distance qui sépare le lieu de prélèvement de l'épandage. Elle permet de diviser le terrain en trois zones : la première localisée jusqu'à 100 mètres du lieu de l'infiltration, la seconde entre 100 et 350 m et la dernière située au-delà de 350 mètres.

Les valeurs les plus élevées, de quelques centaines de milliers de germes à plusieurs millions par ml, s'observent à proximité et jusqu'à environ 100 mètres du lieu de l'infiltration. Il a été permis de déceler l'influence de facteurs externes. Les variations échappent à la température de l'atmosphère extérieure mais sont soumises au régime des eaux. Un trop fort débit d'eaux résiduaires limite la prolifération microbienne, tandis qu'au contraire, elle est favorisée par la dilution de l'effluent en période de pluie.

Un phénomène assez paradoxal a été observé au cours de la première année : on a remarqué une importance d'autant plus grande de la micropopulation que celle-ci se situait plus profondément au niveau des puits situés en un même point, à 40 mètres de l'épandage et creusés à des profondeurs de 6, 8 et 10 mètres. Pendant l'année suivante, ce phénomène disparut et l'on assista à une véritable homogénéisation du milieu.

Dans cette région du terrain, la microflore renferme de nombreuses espèces au métabolisme varié. Les faibles fluctuations de pH peuvent être d'origine microbienne : acidification par production de gaz carbonique et d'acides organiques, alcalinisation par sulfato-réduction ou par libération d'ammoniac. Les souches les plus fréquemment isolées, donc permanentes dans le temps, sont constituées par *Aeromonas liquefaciens*, *Brevibacterium sp.*, *Rhodotorula mucilaginosa* et *Torula sp.*, associées à d'autres espèces temporaires (membres de la famille des *Actinomycetaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae* et *Micrococcaceae*). Le développement de ces derniers micro-organismes semble influencé par le volume et la concentration des liqueurs noires déversées.

Les dosages d'oxydabilité ont montré, par rapport à l'effluent, une diminution notable de la teneur en matières organiques n'ayant que peu de répercussion sur la coloration. Il convient cependant d'être très prudent lorsque l'on interprète les variations de coloration et d'oxydabilité. Ces phénomènes très complexes dépendent naturellement de l'activité enzymatique des micro-organismes mais aussi de l'action physico-chimique des matières humiques du sol conditionnées par les modifications de pH. Les liqueurs noires, alcalines, dispersent les réserves humiques du sol à l'état d'humates sodiques et, par voie de conséquence, subissent une neutralisation rapide. Il en résulte une filtration d'eaux fortement colorées possédant une demande chimique en oxygène très élevée. Le lessivage n'est que temporaire et s'atténue lorsque les réserves en humus tendent à diminuer ;

cependant, la couverture végétale du sol assure l'apport permanent de nouvelles matières humiques et évite l'épuisement du sol. Le lessivage est très visible, de 1959 à 1960, au niveau des puits les plus proches de l'épandage où l'on constate que la coloration s'accroît par rapport à celle de l'effluent et qu'elle augmente avec la profondeur. Bien que les horizons illuviaux d'accumulation d'humus soient superficiels, au maximum à 1 m de profondeur, on doit admettre, comme l'a prouvé l'examen des forages de sols soumis ou non à l'action des eaux résiduaires, que leur solubilisation s'effectue à la faveur des remontées de la nappe d'eaux souterraines. A ceci, s'ajoute le résultat de l'activité des bactéries sulfato-réductrices, chimiosynthétiques, qui, en édifiant leur propre matière vivante à partir d'éléments minéraux, enrichissent les eaux en matières organiques. Leur développement est accru, à l'inverse de celui de la microflore aérobie, par l'apport d'eaux résiduaires concentrées. De plus, la réduction des sulfates donne naissance à des sulfures qui se combinent avec les composés du fer présents dans le sol pour former des sulfures de fer de couleur noire. Il a été également démontré, *in vitro*, que l'acidification des liqueurs noires entraînait une perte de coloration, sensiblement proportionnelle à l'abaissement de pH, par début de floculation des alcali-lignines. Il n'a pas été observé, dans le terrain, d'accumulation sensible de ces substances, consécutive à la neutralisation des eaux résiduaires.

La population microbienne, complexe, puise, pour sa croissance, dans les liqueurs noires les substances facilement biodégradables responsables de la demande biochimique en oxygène et n'engendrant pas de coloration. A ce sujet, on a constaté, expérimentalement et sur le terrain en 1960, que l'infiltration d'un volume élevé de liqueurs noires concentrées, en période de fortes pluies, entraînait la perte de perméabilité du sol explicable par le développement intensif de micro-organismes modifiant, par leurs produits de catabolisme, la structure du sol et en colmatant les interstices. La perte de perméabilité n'est que passagère et ne peut être attribuée, d'après ce qui précède, à l'accumulation des alcali-lignines ; le sol se régénère d'ailleurs par repos et lixiviation naturelle. L'étude analytique de l'épandage a confirmé que la présence d'un nombre élevé de bactéries provoquait un ralentissement de la filtration des eaux résiduaires.

La microflore contribue, également, par la production d'enzymes de nature variée, à l'altération partielle des alcali-lignines. Six espèces : *Acinetobacter viscolactis*, *Empedobacter dormitator*, *Nocardia corallina*, *Nocardia sp.*, *Pseudomonas geniculata* et *Torula sp.*, réduisent dans les conditions de laboratoire, en culture pure, l'oxydabilité des alcali-lignines de 2 à 10 % en 45 jours seulement, en présence d'eaux résiduaires comme seule source de matières organiques. Le processus relève généralement d'une adsorption, à pH neutre, des alcali-lignines, sur les parois microbienne. Il est favorisé par l'adjonction de substances facilement assimilables (glucose), par une teneur en azote de 2 ‰ et par l'aération des cultures. L'association des espèces ne présente que peu d'intérêt sauf dans le cas du mélange *Pseudomonas geniculata-Empedobacter dormitator* où la dégradation atteint 33 %, après 35 jours d'incubation. Sur milieu non tamponné et à teneur élevée en glucides (5 ‰), un plus grand nombre de souches, la plupart acidogènes, attaque les alcali-lignines. La floculation, par acidification

prédomine alors et les rendements sont supérieurs à ceux obtenus précédemment: la décoloration varie entre 63 et 92 % mais le phénomène est d'ordre physico-chimique.

Les eaux résiduaires ne renferment, en moyenne, que de 2 à 3 mg d'azote par litre. Cependant, on observa un enrichissement en cet élément dans les eaux infiltrées, très marqué pendant les premières années d'épandage. L'augmentation de la teneur en azote ne peut provenir que des matières organiques du sol pendant la période de lessivage des réserves humiques du sol ou d'une fixation d'origine biologique. Cette dernière n'a jamais été mise en évidence dans ces eaux, seuls SISLER et ZOBELL (207) ont signalé une telle fixation d'azote atmosphérique par *Desulfovibrio desulfuricans* dans les eaux saumâtres d'estuaires.

Entre 100 et 350 mètres de l'épandage, la population microbienne diminue considérablement et ne dépasse pas quelques dizaines de milliers de germes par ml. *Aeromonas liquefaciens* et *Rhodotorula mucilaginosa* demeurent encore présents mais on note surtout le développement de nombreuses espèces de *Bacillus (B. cereus, B. licheniformis, B. pumilus* et *B. subtilis)*, de *Micrococcus (M. candidus, M. freudenreichii, M. varians)* et quelques représentants de la famille des *Pseudomonadaceae (Acinetobacter, Achromobacter, Empedobacter)*. Les germes sulfato-réducteurs marquent également une nette décroissance.

Jusqu'en 1964, les eaux sont apparues, paradoxalement, très colorées, fortement oxydables et s'enrichissant en azote. Par contre, la teneur en sodium ne subissait pratiquement pas de variations. Les fortes valeurs de couleur, de D.C.O. et d'azote, nettement supérieures à celles des effluents déversés antérieurement, allèrent en décroissant de 1959 à 1964. Cette évolution s'interprète comme les conséquences de l'action physico-chimique du sol, entrevue précédemment, et traduit, en accord avec les résultats expérimentaux sur colonnes de terre, le déplacement de la nappe constituée d'eaux résiduaires solubilisant les acides humiques. On peut admettre que des réactions biochimiques se déroulent simultanément dans les eaux. Le résultat de l'activité microbienne fût masqué pendant les premières années de dissolution des matières humiques mais devint plus tangible à partir de 1965. Sous l'influence d'oxydases microbiennes, les alcali-lignines, dégradées partiellement en bordure de l'épandage, subissent un processus d'humification aboutissant à la production de substances colorées et azotées présentant des analogies avec les acides humiques. L'étude des alcali-lignines extraites avant et après épandage a montré, en effet, pour ces dernières, une augmentation de couleur et du taux d'azote. De nombreux micro-organismes peuvent oxyder les composés phénolés. Parmi ceux-ci, nous avons isolé *Micrococcus varians*, déjà signalé, en 1966, par JAYASANKAR et BHAT (128) pour son aptitude à dégrader ou à oxyder les phénols, *in vitro*, selon les conditions de culture. RAYNAUD et DASTE (189-191) ont montré que des souches de bactéries rétinolytiques étaient capables de s'adapter et de métaboliser le phénol (1962) et, certaines, l'acide protocatéchique.

La surcoloration des eaux doit donc être envisagée favorablement puisqu'elle constitue un indice de la bio-transformation des alcali-lignines.

Il faut, cependant, remarquer que parmi les souches isolées dans cette région, aucune ne dégrade totalement les composés ligneux, en absence de glucose.

En avant du front coloré, c'est-à-dire à une distance supérieure à 350 mètres du lieu de l'infiltration, les eaux s'appauvrissent en matières organiques, en azote et sont décolorées. Le calcul montre, compte tenu des volumes considérables d'eaux rejetées, de la superficie du terrain et des pertes par évapo-transpiration, que les eaux résiduaires ne peuvent s'accumuler dans le sol mais qu'elles sont éliminées après épuration complète avec les eaux naturelles. La population microbienne régresse et atteint seulement quelques milliers de germes par ml. Elle est constituée par *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea*, quelques *Bacillus* (*B. cereus* var. *mycoides*, *B. licheniformis*), *Achromobacter* et *Pseudomonas putida*. Ces micro-organismes prennent part aux phénomènes de déshumification du complexe humo-lignique, dernière phase de l'épuration biologique. Parmi ceux-ci, *Pseudomonas putida* constitue l'élément le plus marquant. En culture pure aérée et à la neutralité, il dégrade environ 17 % des alcali-lignines contenues dans les liqueurs noires, en absence de glucose et après seulement 45 jours de culture. Son développement s'accompagne d'une perte de 24 % de la coloration initiale. Sur milieux aérés non tamponnés et en présence d'une source de carbone complémentaire, les résultats sont beaucoup plus spectaculaires, la floculation des alcali-lignines, par forte acidification, est totale entraînant une perte de coloration de plus de 92 %. De nombreux auteurs dont BIZZINI, FISCHER, PREVOT et RAYNAUD (186-188) ont déjà signalé l'importance des membres de la famille des Pseudomonadacées dans la dégradation des lignines.

Au terme de cette étude, il nous faut faire un bilan. On constate que le dispositif d'épuration se révèle efficace et qu'il possède vis-à-vis des procédés classiques de nombreux avantages. Après onze années de fonctionnement se traduisant par l'élimination d'environ cinq millions de m3 d'eaux résiduaires, la neutralisation naturelle des eaux est toujours aussi efficace et la microflore aussi active. Aucune perte de perméabilité du sol n'a été observée depuis 1960. L'arrêt de l'épandage pendant les mois d'hiver, généralement de décembre à mars, permet la régénération du sol favorisée en cela par les précipitations atmosphériques. On peut estimer comme optimum le rejet quotidien, sur les cinq hectares d'infiltration, de une tonne de D.B.O. Le rapport D.B.O./D.C.O. étant approximativement de 0,3, le rejet de liqueurs noires, ayant par exemple une demande chimique en oxygène de 1000 mg/l sera limité à 3 000-3 500 m3 par jour. Dans la pratique, ce nombre n'a été que très rarement dépassé. Comme dans tout phénomène biologique, les variations brusques sont à éviter.

En tenant compte de ces quelques remarques, le dispositif d'infiltration présente une grande souplesse d'utilisation et ne demande qu'une surveillance très réduite, de plus les frais d'installation comparés à ceux exigés par les procédés classiques apparaissent très réduits. L'entretien, par mise en service alternée des bassins, sans arrêt de l'épandage, s'avère peu onéreux et se trouve facilité par la présence d'un sol meuble. Un des aspects les plus intéressants de ce procédé qui le différencie des méthodes

classiques d'épuration, est la réduction très importante de la demande chimique en oxygène entraînant la décoloration des eaux, sans accumulation de composés ligneux dans le sol ni formation de boues. Les sels de sodium, régulièrement éliminés du sol, ne constituent aucun préjudice à l'épuration biologique et l'on ne note aucun signe de destruction de la couverture végétale. De plus, le dosage de l'ion sodium, caractéristique de ces eaux, permet de suivre le cheminement des liqueurs noires.

De nombreux résultats positifs sont acquis mais une inquiétude subsiste : l'épandage des liqueurs noires entraîne l'appauvrissement du sol en azote, élément indispensable à la prolifération microbienne. Afin de tenter d'améliorer les processus d'épuration, il serait utile d'enrichir les eaux résiduaires non seulement en azote mais également en phosphore, pratiquement absent. Pour respecter les valeurs des rapports D.B.O./N/P généralement fixés à 100/5/1 dans la plupart des stations d'épuration, il conviendrait d'apporter théoriquement par jour, 50 kg d'azote et 10 kg de phosphore pour une tonne de D.B.O. éliminée, ces quantités pouvant être, vraisemblablement, diminuées après expérimentation.

Ce dispositif d'épandage pourrait être transposé à d'autres sols en tenant compte de la composition et du volume de l'effluent à rejeter ainsi que de la superficie du terrain disponible. La couverture végétale sera conservée au maximum afin de faciliter les pertes en eau par évapo-transpiration. Dans tous les cas, un examen hydrogéologique s'impose de façon à déterminer le sens d'écoulement des eaux afin d'éviter tous risques accidentels de contamination de nappes phréatiques servant à l'alimentation. Une étude à l'échelon pilote permettra également d'observer ce que la nature est capable d'offrir et d'augurer sur les chances de réussite du procédé.

L'épuration des eaux résiduaires par infiltration dans le sol a fourni au scientifique et au naturaliste que nous sommes le sujet d'une étude captivante et plus complexe qu'elle ne pouvait le paraître à première vue. Nous ne prétendons pas en avoir résolu tous les problèmes. De nombreux points obscurs subsistent surtout au niveau de la ligninolyse bactérienne. Des recherches complémentaires devront être entreprises dans ce domaine : nous nous efforcerons d'isoler un plus grand nombre de souches en différents points du terrain, de les adapter à la dégradation des liqueurs noires et d'étudier les modalités de la ligninolyse. Seule une connaissance aussi complète que possible des phénomènes de biodégradation des alcali-lignines permettra de résoudre efficacement le problème de l'épuration biologique des eaux résiduaires de papeterie. Tous ces travaux trouveront parfaitement leur place dans le cadre que s'est tracé le laboratoire de Botanique appliquée et de Microbiologie, voici maintenant plus de quinze ans. Dans l'immédiat, nous avons la satisfaction d'avoir contribué, si modestement soit-il, à la sauvegarde de la nature en luttant contre la pollution des eaux.

B I B L I O G R A P H I E

1 - ADLER (E.) - Uber den Stand der Ligninforschung. *Papier*, 1961, *15*, n° 10, 604-9.

2 - AGERSBORG (H. P. K.) et HATFIELD (D.W.) - The biology of a sewage treatment plant. *Sewage Works J.*, 1929, *1*, 411.

3 - ALLEN (L.A.) - General microbiological processes. Microbiology of Water, sewage and industrial effluents. *Rep. Progr. appl. Chem.*, 1963, *48*, 532-41.

4 - AMIN (P.M.) et GANAPATI (S.V.) - Occurence of *Zoogloea* colonies and protozoans at different stages of sewage purification. *Appl. Microbiol.*, 1967, *15*, n° 1, 17-21.

5 - ANDERSON (R.E.) Isolation and generic identification of the bacteria from activated sludge flocs with studies of floc formation. *Dissert. Abstr.*, 1964, *25*, n° 4, 2170.

6 - Anonyme - Water Pollution research, 1967. *Wat. Pollut. Res.*, 1967 paru 1968.

7 - Anonyme - Aerobic biological treatment processes. Percolating filters. *Wat. Pollut. Res.*, 1968 paru 1969.

8 - ANTONIU (R.) - Résultats obtenus en Roumanie dans l'épuration biologique naturelle en agriculture des eaux usées urbaines et industrielles. *La Tribune du Cébedeau*, 1968, *297-298*, 394-9.

9 - A. O. A. C. - Official methods of the Association of official agricultural Chemists. 9ème édition, 1960, Washington 4, D.C.

10 - ARDERN (E.) et LOCKETT (W.T.) - *J. Soc. Chem. Ind.*, 1914, *10* et *33* *in* LECLERC (144).

11 - A. S. T. M. - Standard method for identification of types of microorganisms and microscopic matter in industrial Water and industrial waste water. *A. S. T .M., spec. techn. Public.*, 1964 paru 1965, *148 G*, 396-401.

12 - BAYLIS (P. E. T.) - Lignin. *Sci. Progr.*, 1960, *48*, n° 191, 409-34.

13 - BECK (G.), BRUCKERT (S.) et DOMMERGUES (Y.) - Un milieu de culture pour les micro-organismes dégradant l'acide vanillique. *Biologie du sol*, 1969, *11*, 36-37.

14 - Bergey's Manual of determinative Bacteriology. *The Williams and Wilkins C°*, Baltimore, 1957.

15 - BERNIAC (M.) - Modifications d'un sol de forêt landaise soumis à l'irrigation avec des eaux résiduaires de papeterie Kraft. *Thèse de 3ème cycle*, Bordeaux, 1969.

16 - BERTHIER (R.), FOURNIER (M.) et LEGRAND (A.) - Etudes du comportement des différentes fractions d'un effluent d'usine Kraft. *Chimie et Industrie*, 1957, *3*, n° 78.

17 - BHATLA (M. N.), STACK (V. T. jr.) et WESTON (R. F.) - Design of waste water treatment plants from laboratory data. *J. Wat. Pollut. Control. Feder.*, 1966, *38*, n° 4, 601-13.

18 - BIELLMANN (J. F.), WENNIG (R.), DASTE (P.) et RAYNAUD (M.) - Microbial degradation of diterpenic acids. *Chem. Communic.*, 1968,*3*, 168-9.

19 - BLOSSER (R.O.) et OWENS (E.L.) - Irrigation et épandage des eaux résiduaires d'usine à pâte. *Traduction de Water and Sewage Works*, 1964.

20 - BOARD (R. G.) - Biological aspects of organic waste treatment. *Wat. Pollut. Control*, 1968, *67*, n° 6, 614-21.

21 - BONAFE (N.) - Etude du métabolisme de trois micro-organismes aérobies contribuant à l'épuration des eaux résiduaires de papeterie Kraft. *Diplôme d'études supérieures de Sc. Nat.*, Bordeaux, 1966.

22 - BORUFF et BUSWELL - *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, *56*, 886 *in* POCHON (180).

23 - BOSCH (F. M.), ROELS (R.) et MICHIELS (L.) - Le traitement aérobie des eaux résiduaires de brasserie. *La Tribune du Cébedeau*,1969, *22*, n° 305.

24 - BREBION (G.) - Description d'un appareil destiné à l'expérimentation toxicologique sur le poisson, suivant les conditions standard préconisées à Zurich. *A. T. I. P.*, 1956, n° 1, 9-12.

25 - BREBION (G.) - Possibilités de traitement biologique des eaux résiduaires industrielles. *Journ. et Pollut. industr. Eaux*, Paris, 1964.

26 - BREBION (G.) et CABRIDENC (R.) - Etude de l'épuration par voie biologique des eaux résiduaires industrielles par action de souches sélectionnées et adaptées de micro-organismes. *Revue de Pathologie comparée*, 1965, *2*, n° 3, 163-73.

27 - BREBION (G.) et CABRIDENC (R.) - Méthode d'étude au laboratoire de la toxicité des effluents industriels et de leurs possibilités de biodégradation. *Terres et Eaux*, 1970, *62*, 15-22.

28 - BREBION (G.), CABRIDENC (R.) et HURIET (B.) - Etude des possibilités de biodégradation des effluents industriels. Application à la biodégradation des phénols. *Rev. Inst. fr. Pétrole*, 1967, *22*, n° 6, 1029-52.

29 - BREBION (G.), CABRIDENC (R.) et ROGEON (M.)- Etude en laboratoire de l'épuration mixte d'effluents urbains et industriels renfermant du phénol. *La Tribune du Cédebeau*, 1966, *19*, n° 275, 406-12.

30 - BREBION (G.) et HURIET (B.) - Epuration d'eaux résiduaires industrielles à fortes charges par la technique des lits bactériens à ruissellement. *La Tribune du Cébedeau*, 1968, *21*, n° 290,28-34.

31 - BREBION (G.), PRAT (S.) et PRAT (J.) - A study of purification by biological means, involving the successive actions of selected and adapted strains of microorganisms for the treatment of residual trade wastes from paper pulp factories. *Air Wat. Pollut.*, 1963, *7*, n° 45, 413-425.

32 - BREILLAT (N.) - Etude de quelques micro-organismes aérobies contribuant à l'épuration des eaux résiduaires de papeterie Kraft. *Diplôme d'études supérieures de Sc. Nat.*, Bordeaux, 1967.

33 - BRISOU (J.) - A propos de l'auto-épuration des eaux par *Bdellovibrio*. *Bull. Acad. nation. Fr.*, 1968, *152*, n° 28-29, 502-5.

34 - BROADBENT (F. E.) - *Proc. Soil Sci. Soc. Am.*, 1954, *18*, 165-69 *in* DOMMERGUES et MANGENOT (77).

35 - BROUZES (P.) - La régulation des processus biologiques dans l'épuration des eaux résiduaires (2ème partie). *Techn. Sci. municip.*, 1969, *64*, 233-38.

36 - BROWN (T. J.) - A study of the protozoa in a diffused air activated sludge plant. *Inst. Sewage Purific. J. Proc.*, 1965, *4*, 375-8.

37 - BRUCE (A. M.) - Percolating filters. *Process Biochem.*, 1969, *4*,n° 4, 19-23.

38 - BUCHANAN (R. E.) - General systematic Bacteriology. *The Williams and Wilkins C°*, Baltimore, 1925.

39 - BUCKMAN (H. O.) et BRADY (N. C.) - Les sols : Nature et propriétés. Précis d'édaphologie. *Intercontinental Editions*, New York,1960. *Les Editions d'Organisation*, Paris.

40 - BURBANK (N.C. jr.), COOKSON (J. J.), GOEPPNER (J.) et BROOMAN (D.) - Isolation and identification of anaerobic and facultative bacteria present in the digestion process. *Air Wat. Pollut.*, 1966, *10*, n° 5, 327-42.

41 - BURCHARD (C. H.) - Barometrischer Vibrations - B. S. B. II - Messung von Kläranlagenablaüfen. *Gas-U. Wasserfach.*, 1968, *109*, n° 42, 1189-92.

42 - BURNS (O. B.) et ECKENFELDER (W. W.) - A statistical study of five years operation of the West Virginia Pulp and Paper Compagny's Waste Treatment Plant. *Proc. of the 18th. Industrial Waste Conference, Engineering Bulletin of Purdue University*, 1964, *48*, n° 3/115, 83-94.

43 - BUSCHE (L. R.) - The Klason lignin determination as applied to aspenwood with special reference to acid-soluble lignin. *Dissert. Abstr.*, 1960, *21*, n° 1, 34.

44 - BUSWELL (A. M.) - The chemistry of water and sewage treatment. *American Chemical Society*, 1928, Monograph. n° 38.

45 - BUSWELL (A. M.) - The biology of activated sludge. An historical review. *Sewage Works J.*, 1931, *3*, 362.

46 - BUSWELL (A. M.) et LONG (H. L.) - Microbiology and theory of activated sludge. *J. Amer. Wat. Wks. Ass.*, 1923, *10*, 309.

47 - BUTTERFIELD (C. T.) - Studies of sewage purification. II. A zoogleaforming bacterium isolated from activated sludge. *Publ. Hlth. Rep., Wash.*, 1935, *50*, 671.

48 - BUTTERFIELD (C. T.), RUCHHOFT (C. C.) et Mc NAMEE (P. D.) - Studies of sewage purification. VI. Biochemical oxidation by sludges developed by the pure culture of bacteria isolated from activated sludge. *Sewage works J.*, 1937, *9*, 1[illegible].

49 - BUTTERFIELD (C. T.) et WATTIE (E.) - Studies of sewage purification. XV. Effective bacteria in purification by trickling filters. *Sewage works J.*, 1941, *13*, 639.

50 - BUTTIAUX (R.) - Le déversement en mer des eaux résiduaires. *Bull. Inst. nat. Santé Rech. méd.*, 1968, *23*, 623-37.

51 - CALDWELL (E. S.) et STEELINK (C.) - Phenoxy-radical intermediates in the enzymatic degradation of lignin model compounds. *Biochim. biophys. Acta*, 1969, *184*, 420-31.

52 - CAMBIER (R.) - Sur l'épuration des eaux d'égout par les boues activées. *C. R. Acad. Sci.*, 1920, *170*, 681-4.

53 - CARPENTER (W. L.), VAMVAKIAS (J. C.) et GELLMAN (I.) - Temperature relation ships in aerobic treatment and disposal of pulp and paper wastes. *J. Wat. Pollut. Control Feder.*, 1968, *40*, n° 5, part I, 733-40.

54 - CATROUX (G.), FOURNIER (J.C.) et RIVIERE (J.) - Mise en évidence rapide de l'utilisation des acides phénol par les souches bactériennes isolées du sol. *Ann. Inst. Pasteur*, 1969, *116*, n° 1, 99-102.

55 - CAVEL (L.) - Contribution à l'étude des boues activées. *C.R. Acad. Sci.*, 1924, *179*, 1095-8.

56 - CAZAUX (P.) et SECHET (J.) - A propos de la microflore des eaux résiduaires d'usines de pâte de cellulose. *Rev. Pathol. génér. Physiol. Clin.*, 1957, *689*, 989-95.

57 - CHADEYRON (L.) - Quelques remarques concernant le déversement des eaux résiduaires des usines traitant le pin maritime par le procédé au sulfate. *Conférence Union Ingénieurs de France*, Bordeaux, 1956.

58 - CHEDIN, BREBION (G.) et PRAT (J.) - Epuration par voie biologique des eaux résiduaires diluées provenant de fabriques de pâte michimique de bois feuillus au monosulfite de soude. *Centre technique de l'Industrie des papiers, cartons et celluloses*, Paris, 1960.

59 - CHUDOBA (J.) - The treatment of industrial waste waters by activated sludge process with complete mixing. *Sbor. vys. Sk. Chem.technol. Praze Oddil Technol Vody*, 1963, *7*, n° 2, 33-47.

60 - CLARK (H. W.) et GAGE (S. M.) - A review of twenty-one years experiments at the Lawrence Experimental Station. *40th. Annual Report of Massachusetts State Board of Health*, 1908, *499*.

61 - COLAS (R.) - La pollution des eaux. *Presses Universitaires France*, Paris, 1962.

62 - COOKE (W. B.) - Trickling filter ecology. *Ecology*, 1959, *40*, 273.

63 - COOKE (W. B.) - The enumeration of yeast populations in a sewage treatment plant. *Mycologia*, 1965, *57*, n° 5, 696-703.

64 - COURMONT (P.), ROCHAIX (A.) et LAUPIN (F.) - Sur le rythme de la disparition de l'ammoniaque au cours de l'épuration des eaux d'égout par le procédé des boues activées. *C.R. Acad. Sci.*, 1920, *173*, 1498-9.

65 - COURTOIS (H.) - Uber den Zweiwandabbau durch Bakterien in Nadelholz. *Holzforschung*, 1966, *20*, n° 5, 148-54.

66 - CRAWFORD (S. C.) - Spray irrigation of certains sulfate pulp mill wastes. *Sewage and Industrial Wastes*, 1958, *30*, n° 10, 1266-72.

67 - CURRIE (D. G.) et ROBERGE (J. L.) - Pollution Control at Bathurst Paper Limited New Richmond, P. Q. *Pulp and paper Mag. of Canada*, 1967, *68*, n° 2, 69-70.

68 - DAHLGREN (E. H.) - A pulp mill's approach to the utilization of spent sulfite liquor. *J. Wat. Pollut. Control Feder.*, 1964, *36*, n° 12, 1543-5.

69 - DAVEY (B. B.) et TURNER (M.) - Some phenol decomposing strains of *Pseudomonas*. *J. appl. Bacteriol.*, 1961, *24*, n° 1, 78-81.

70 - DAY (W. C.), PELCZAR (M. J.) et GOTTLIEB (S.) - *Arch. Biochem.*, 1949, *23*, 360 *in* SCHUBERT (202).

71 - DEGREMONT Société - Mémento technique de l'eau 1966. *Degrémont*, 1966.

72 - DEMME (H.) - Beiträge über den mikrobiellen Abbau verschiedener Ligninen und Ihre Bedeutung für die Bildung der organischen Bodensubstanz. *Thèse Leipzig*, 1932, 1-38.

73 - DIAS (F. F.) et BHAT (J. V.) - Microbial ecology of activated sludge. I. Dominant bacteria. *Appl. Microbiol.*, 1964, *12*, 412-17.

74 - DIAS (F. F.) et BHAT (J. V.) - Microbial ecology of activated sludge. II. Bacteriophages, *Bdellvibrio*, Coliforms, and other organisms. *Appl. Microbiol.*, 1965, *13*, 257-61.

75 - DIENERT (F.) - La nature des boues activées. *C.R. Acad. Sci.*, 1917, *165*, 1116-1117.

76 - DIENERT (F.) - Sur la formation de la boue activée. *C.R. Acad. Sci.*, 1920, *170*, 762-3.

77 - DOMMERGUES (Y.) et MANGENOT (F.) - Ecologie microbienne du sol. *Masson et C°*, Paris, 1970.

78 - DUCHAUFOUR (Ph.) - Précis de pédologie. *Masson et C°*, Paris, 1965.

79 - DURAND (C.) - Les eaux résiduaires des fabriques de papier et pâte à papier. *Revue de l'Apave*, 1966, *47*, n° 155, 25-42.

80 - ECKENFELDER (W. W. jr.) - New concepts in biological waste treatment process design. *Sbor. vys. Sk. Chem.-technol. Praze Oddil Technol. Vody*, 1966, *9*, 47-72.

81 - ERIKSON (D.) - *J. Bact.*, 1941, *41*, 277 *in* PREVOT (185).

82 - EVELEIGH (D. E.) et BREWER (D.) - Ecological observations on the fungi and bacteria in slime accumulations in a paper mill. *Canada J. Bot.*, 1964, *42*, n° 1, 35-43.

83 - FLAIG (W.) - Effects of microorganisms in the transformation of lignin to humic substances. *Geochim. cosmochim. Acta*, 1964, *28*, n° 10, 1523-35.

84 - FLAIG (W.), SCHOBINGER (U.) et DEUEL (H.) - *Chem. Ber.*, 1959, *92*, 1973-82 *in* DOMMERGUES et MANGENOT (77).

85 - FLOWER (W. A.) - Spray irrigation. A positive approach to a perplexing problem. *Proc. of the 20th. Industrial Waste Conference, Engineering Bulletin of Purdue University*, 1965, *49*, n° 4/118, 679-83.

86 - FONTENAY (J. R.) - Les progrès réalisés pour lutter contre la pollution de l'eau et de l'air. *Papeterie*, 1970, *92*, n° 9, 820,823-6, 835-6.

87 - FOURNIER (G.) - Recherches sur l'épuration biologique des eaux résiduaires de papeterie Kraft. *Diplôme d'études supérieures de Sc. Nat.*, Bordeaux, 1962.

88 - FRIEDMAN (B. A.) et DUGAN (P.R.) - Identification of zooglea species and the relation ship to zoogloeal matrix and floc formation. *J. Bact.*, 1968, *95*, n° 5, 1903-9.

89 - FUKUZUMI (T.) - Enzymatic degradation of lignin. I. Paper chromatographical separation of intermediate degradation products of lignin by the wood rotting fungus *Poria subacida* (Peck). *Bull. agric. chem. Soc. Jap.*, 1960, *24*, n° 7, 728-38.

90 - GANCZARCZYK (J.) - Decomposition of lignin compounds during biological treatment of pulp mill effluents. *Ass. internation. Limnol. théor. appl.*, 1966, *16*, partie II, 926-33.

91 - GANN (J. D.), COLLIER (R. E.) et LAWRENCE (C. H.) - Aerobic bacteriology of waste stabilisation pounds. *J. Wat. Pollut. Control Feder.*, 1968, *40*, n° 2, 1ère partie, 185-91.

92 - GAUCHER (G.) - Traité de Pédologie agricole. Le sol. *Dunod*, Paris, 1968.

93 - GAUDY (A. F. jr.) et GAUDY (E. T.) - Microbiology of waste waters. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1966, *20*, 319-36.

94 - GAY (P. L.) - Improved Effluent Treatment of Pulp and Paper Wastes by surface aeration. *4th. Water Conference, T.A.P.P.I.*, 1967, 34-44.

95 - GAYFORD (C. G.) et RICHARDS (J. P.) - Isolation and enumeration of aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. *J. appl. Bacteriol.*, 1970, *33*, n° 2, 342-50.

96 - GEHM (H. W.) et GELLMAN (I.)- Pratice, research and development in biological oxidation of pulp and paper mill effluents. *J. Wat. Pollut. Control Feder.*, 1965, *37*, n° 10, 1392-8.

97 - GELLMAN (I.) - B. O. D. Reduction of Paper, Paperboard and weak pulping wastes by irrigation. *Pulp and Paper Mag. Canada*, 1958.

98 - GILCREAS (F. W.) - Laboratory control of sewage treatment. IX. The biology of sewage treatment. *Munic. Rec.*, 1927, *8*, 225.

99 - GIRARD (H.) et ROUGIEUX (R.) - Techniques de microbiologie agricole. *Dunod*, Paris, 1967.

100 - GODA (T.) et NAKANISHI (H.) - Mixing and microbial kinetics of activated sludge process. *Mem. Fac. Engng., Kyoto Univ.*, 1965, *27*, n° 1, 31-46.

101 - GOTTLIEB (S.), DAY (W. C.) et PELCZAR (M. J.) - *Arch. Biochem.*, 1950, *25*, 449 *in* SCHUBERT (202).

102 - GOTTLIEB (S.), DAY (W. C.) et PELCZAR (M. J.) - *Phytopathology*, 1950, *40*, 926 *in* SCHUBERT (202).

103 - GOTTLIEB (S.) et PELCZAR (M.J.) - Microbial aspects of lignin degradation. *Bacteriol. Rev.*, 1951, *15*, 55-76.

104 - GREEN (S. R.) - Proteolysis and proteolytic organisms. *Proc. Rudolfs Res. Conf. Principles Appl. Aquatic. Microbiol.*, New Brunswick, 1963.

105 - GRIFFE (J.) - Les eaux résiduaires des fabriques de pâte à papier par le procédé au sulfate. *Rev. Inst. Pasteur, Lyon*, 1967, *1*, n° 1, 125-33.

106 - GUELIN (A.) et LEPINE (P.) - Isolement d'un parasite bactérien actif sur les germes Gram positif à partir d'échantillons d'eau polluée. *C.R. Acad. Sci.*, 1968, *266*, 2508-9.

107 - HAIDER (K.) - Utersuchungen über den mikrobiellen Abbau von Lignin. *Zbl. Bakteriol., Parasitenkde Infekt-Krankh.Hyg.*, 1965, *198*, n° 13, 308-16.

108 - HAIDER (K.) et DOMSCH (K. H.) - Abbau und Umsetzung von lignifiziertem Pflanzenmaterial durch mikroskopische Bodenpilze. *Archiv. Mikrobiol.*, 1969, *64*, 338-48.

109 - HARDISSON (C.) et POCHON (J.)- Synthèse de substances para-humiques par *Azotobacter chroococcum*. I. Conditions de culture et extraction de la substance. *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, *111*, n° 1, 66-75.

110 - HARMSEN (L.) et NISSEN (T. V.) - Timber decay caused by bacteria. *Nature*, 1965, *206*, n° 4981, 319.

111 - HARRIS (F. W.), ANDERSON (T.) et COCKBURN (T.) - Biological and physical properties of activated sludge. *Waterworks J.*, 1927, *66*, 24.

112 - HENDERSON (M.E.K.) - Release of aromatic compounds from birch and spruce sawdusts during decomposition by white rot-fungi. *Nature*, 1955, *175*, 634.

113 - HENDERSON (M.E.K.) - Isolation, identification and growth of some soils hyphomycetes and yeast-like fungi which utilize aromatic compounds related to lignin. *J. gen. Microbiol.*, 1961, *26*, 149-54.

114 - HENDERSON (M.E.K.) - The metabolism of aromatic compounds related to lignin by some hyphomycetes and yeast-like fungi of soil. *J. gen. Microbiol.*, 1961, *26*, 155-65.

115 - HIGUCHI (T.), KAVAMURA (I.) et KAVAMURA (H.) - Properties of the lignin in decayed wood. *J. Japan Forest Soc.*, 1955, *37*, 298-302.

116 - HIGUCHI (T.), KAVAMURA (H.) et HAYASCHI (I.) - Biochemical study of wood rotting fungi. V. The enzymatic oxidation of lignin. *J. Japan Wood Res. Soc.*, 1956, *2*, 31-35.

117 - HOLTJE (R. H.) - The biology of sewage sprinkling filters. *Sewage Works J.*, 1943, *15*, 14.

118 - HURIET (B.) - Aperçus des données actuelles sur la biologie de *Sphaerotilus natans*. *Centre Technique de l'Industrie des Papiers, cartons et celluloses-Eaux résiduaires*, n° 3.

119 - IMAMURA (S.) et ASHIZAWA (Y.) - Etudes sur la boue activée. (I). *Jap. J. Hyg.*, 1966, *21*, n° 1, 44-7.

120 - IMHOFF (K. R.) - Manuel de l'Assainissement urbain. *Dunod*, 5ème édition en langue française, Paris, 1970.

121 - ISAAC (P.C.G.) et JAMES (A.) - The bacterial ecology of trickling filters. *Ass. internat. Limnol. théor. appl.*, 1964, *15*, n° 2, 620-30.

122 - ISHIKAWA (H.), SCHUBERT (W. J.) et NORD (F. F.) - Investigations on lignin and lignification. XXVII. The enzymatic degradation of softwood lignin by white-rot fungi. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, *100*, 131-39.

123 - ISHIKAWA (H.), SCHUBERT (W. J.) et NORD (F. F.) - Investigations on lignin and lignification. XXVIII. The degradation by *Polyporus versicolor* and *Fomes fomentarius* of aromatic compounds structurally related to softwood lignin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, *100*, 140-49.

124 - ISHIKAWA (H.), SCHUBERT (W. J.) et NORD (F. F.) - Investigations on lignin and lignification. XXX. Enzymatic degradation of guaiacylglycerol and related compounds by white rot fungi. *Biochem. Z.*, 1963, *338*, 153-63.

125 - JACQUIN (F.) - *Bull. Ecole Nat. Sup. Agron. Nancy*, 1963, *5*, 3-156 *in* DOMMERGUES et MANGENOT (77).

126 - JAMES (A.) - The bacteriology of trickling filters. *J. appl. Bact.*, 1964, *127*, n° 2, 197-207.

127 - JASCHHOF (H.) - Preliminary studies of the decomposition of lignin by bacteria isolated from lignit. *Geochim. cosmochim. Acta*, 1964, *28*, n° 10, 1623.

128 - JAYASANKAR (N. P.) et BHAT (J. V.) - Mode of attack on phenol by a *Micrococcus sp.* isolated from coir rets. *Can. J. Microbiol.*, 1966, *12*, n° 5, 1031-39.

129 - JOHNSON (J.W.H.) - A contribution to the biology of sewage disposal. *J. econ. Biol.*, 1914, *9*, n° 105, 127.

130 - JOYCE (C. S.) et KLEINERT (T. N.) - Short wavelength Ultraviolet Absorption of various lignins and related substances. *Pulp and Paper Mag. Canada*, 1957, *53*.

131 - KAMM (W. F.) - Bacterial purification of sewage. *Univ. Ill. Bull., State water Survey Series*, 1917, *14*, 146.

132 - KAN KIUCHI, HIROSHI KURAISHI, HARUYOSHI MUROOKA, KÔ AIDA et TEIJIRO UEMURA. - Floc formation in activated sludge. I. Flocforming activities of representative bacteria isolated from activated sludge. *J. gen. Appl. Microbiol.*, 1968, *14*, 387-97.

133 - KAN KIUCHI, HIROSHI KURAISHI, HARUYOSHI MUROOKA, KÔ AIDA et TEIJIRO UEMURA. - Floc formation in activated sludge. II. Identification of twelve representative strains isolated from activated sludge. *J. gen. Appl. Microbiol.*, 1968, *14*, 399-409.

134 - KANSKA (Z.) - Sewage treatment by activated sludge bacteria. *Ass. internation. Limnol. théor. appl.*, 1966, *16*, part. II, 911-4.

135 - KEHR (D.) - Biologische Kleinkläranlagen. Systeme und Erfahrungen. *Rev. suisse Hydrol.*, 1964 paru 1965, *26*, n° 2, 383-93.

136 - KIPP (R. J.) - Glucose utilization by a floc forming bacterium. *Dissert. Abstr.*, 1966, *26*, n° 9, 5358.

137 - KIRK (T. K.) et HARKIN (J. M.) - Oxidation of guaiacyl and veratrylglycerol β guaiacyl ether by *Polyporus versicolor* and *Stereum frustulatum*. *Biochim. biophys. Acta*, 1968, *165*, 134-44.

138 - KIRK (T. K.) et HARKIN (J. M.) - Degradation of the lignin model compounds syringylglycol β gaiacyl ether by *Polyporus versicolor* and *Stereum frustulatum*. *Biochim. biophys. Acta*, 1968, *165*, 145-63.

139 - KRASSILNIKOV (N. A.) - Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten. *Veb. Gustav Fischer Verlag*, Jena, 1959.

140 - KRASSILNIKOV (N. A.) - Key to actinomycetales. *Israël Program for Scientific Translations*, Jerusalem, 1966.

141 - LABOREUR (P.) - Contribution à l'étude de l'action des micro-organismes sur la lignine. *VII° Congr. Int. Botan.*, Paris, 1954. Rapp. et comm. aux sect. 21-27, 43-45.

142 - LACKEY (J. B.) - Biology of sewage treatment. *Sewage Works J.*, 1949, *21*, 659.

143 - LE BRENN (M.) - Dégradation des lignines des liqueurs noires par trois souches isolées des eaux résiduaires. *Diplôme d'Etudes Supérieures Sc. Nat.*, Bordeaux, 1967.

144 - LECLERC (E.) - Notes du cours d'épuration des eaux et de technique sanitaire. *Cébédoc*, Liège.

145 - LECOQ (H.) - Cérimétrie appliquée à l'analyse des eaux. *Communication au XXIX° Congrès International de Chimie Industrielle*, section III, Paris, 1956.

146 - LEVINE (M.) - *Ind. Eng. Chem.*, 1935, *27*, 195 *in* POCHON et DE BARJAC (180).

147 - LIEBMANN (H.) - Les micro-organismes indicateurs dans l'aération des eaux. *Die 3.Reinigungsstufe und die Wasser-und Abwasser belüftung*, 1965, 367-78.

148 - LODDER (J.) et KREGER-VAN RIJ (N.J.W.) - The Yeasts. *North-Holland Publishing C°*, Amsterdam, 1952.

149 - LUBET (P.) et SECHET (J.) - Méthodes d'étude et de contrôle biologique des eaux résiduaires de papeterie Kraft. *Chimie et Industrie*, 1957, *3*, n° 78, 294-99.

150 - Mc KINNEY (R. E.) - A fundamental approach to the activated sludge process. II. A proposed theory of floc formation. *Sewage industr. wastes*, 1952, *24*, 280.

151 - Mc KINNEY (R. E.) - Staining bacterial polysaccharides. *J. Bact.*, 1953, *66*, 453.

152 - Mc KINNEY (R. E.) - Biological flocculation *in "Biological Treatment of sewage and industrial wastes", vol. 1, Eds. Mc Cabe and Eckenfelder (W.W.)*. Londres, 1956.

153 - Mc KINNEY (R. E.) - Microbiological process report activity of micrcorganisms in organic waste disposal. *Appl. Microbiol.*, 1957, *5*, 167.

154 - Mc KINNEY (R. E.) et HORWOOD (M. P.) - A fundamental approach to the activated sludge process. I. Floc-producting bacteria. *Sewage Industr. Wastes*, 1952, *24*, 117.

155 - Mc KINNEY (R. E.) et WEICHLEIM (R. G.) - Isolation of floc producing bacteria from activated sludge. *Appl. Microbiol.*, 1953, *1*, 259.

156 - Mc LACHLAN (W. R.) - A description of the Effluent Disposal system at consolitaded Paper Corporation's New Bleached Kraft Pulp Mill near Portage du Fort, Pontiac Country, P.Q. *Pulp and Paper Mag. Canada*, 1967, *68*, n° 2, 57-8.

157 - MANGENOT (F.) - *Mater. u. Organismen*, 1966, *1*, 333, 342 *in* DOMMERGUES et MANGENOT (77).

158 - MANGENOT (F.) et REYMOND (J.) - *Revue gén. Bot.*, 1963, *70*, 107-29 *in* DOMMERGUES et MANGENOT (77).

159 - MANIL (P.) - Microbiologie et épuration des eaux. *La Technique de l'eau et de l'Assainissement*, 1967, *241*, 17-20.

160 - MARCHAND (M.) et SECHET (J.) - Epuration biologique des liqueurs noires de papeterie Kraft. *Rapport non publié*, 1960.

161 - MAYAUDON (J.) et BATISTIC (L.) - Dégradation biologique de la lignine ^{14}C dans le sol. *Ann. Inst. Pasteur*, 1970,*118*, n° 2, 191-98.

162 - MOREAU (F.) - Les Champignons. *Paul Lechevalier*, Paris,1953.

163 - MULLER (W. J.) - Fortschritte des Belebungsverfahrens der Abwasserreinigung. *Gas. U. Wasserfach.*, 1964, *105*, n° 28, 761-5.

164 - National Council for Stream Improvement - Identification et facteurs des conditions favorisant la pousse des organismes responsables des infestations du limon des rivières. *Bulletin technique*, n° 98, 1957 (traduction).

165 - National Council for Stream Improvement - Manual for the study of slime infestations. *Bulletin technique*, n° 106, 1958.

166 - National Council for Stream Improvement - Rapports D.C.O. et D.B.O. des eaux résiduaires, d'usine Kraft, brutes et traitées biologiquement. *Bulletin technique*, n° 193 (traduction).

167 - NICOULEAU (J.) - Evolution biochimique des eaux résiduaires de papeterie Kraft au cours de leur épuration. *Diplôme d'Etudes Supérieures Sc. Nat.*, Bordeaux, 1962.

168 - NORD (F. F.) - The formation of lignin and its biochemical degradation. *Geochim. cosmochim. Acta*, 1964, *28*, n° 10, 1507-22.

169 - NORD (F. F.) - On the biochemistry of lignin. *T.A.P.P.I.*, 1964, *47*, n° 10, 624-28.

170 - N.S.S.I. - Epandage par irrigation et infiltration dans le sol. *Bulletin mensuel*, 1964, *2*, n° 5 (traduction).

171 - OGLESBY (R. T.), CHRISTMAN (R. F.) et DRIVER (C. H.) - The biotransformation of lignin to humus : facts and postulates. *Adv. appl. Microbiol.*, 1967, *9*, 171-84.

172 - PAINTER (H. A.) - Microbiology of waste treatment processes. *Progr. appl. chem.*, 1965, *50*, 403-12.

173 - PAINTER (H. A.) et HOPWOOD (A. P.) - Microbiology of waste treatment processes. *Progr. appl. chem.*, 1967, *52*, 491-504.

174 - PALUCH (J.) - Microflora of a river polluted with cellulose and paper mill wastes. *Acta Microbiol. Pol.*, 1965, *14*, n° 3-4, 327-36.

175 - PAOLETTI (A.) et DE SIMONE (E.) - Un nuovo fattore di autodepurazione delle acque : "*Bdellovibrio bacteriovorus*". *Riv. ital. Igiene*, 1967, *27*, 466-80.

176 - PETERS (J.G.) et Mc NEAL - Complete waste treatment for a Paperboard Company. *Public Works*, 1963, *94*, n° 12, 99-102.

177 - PHILLIPS, WEIHE et SMITH - *Soil Sc.*, 1930, *30*, 383 *in* POCHON et DE BARJAC (180).

178 - PLAISANCE (G.) et CAILLEUX (A.) - Dictionnaire des sols. *La Maison Rustique*, Paris, 1958.

179 - POCHON (J.) - Manuel technique d'analyse microbiologique du sol. *Masson et C°*, Paris, 1954.

180 - POCHON (J.) et DE BARJAC (H.) - Traité de microbiologie des sols. *Dunod*, Paris, 1958.

181 - PÖNNINGER - Der künstlich belüftete Tropfkörper. *Editions Oldenbourg*, Munich, 1938.

182 - PRAKASAM (T. B. S.) - Enumeration, characterization and adaptation of aerobic heterotrophic bacterial populations of activated sludge. *Dissert.Abstr.*, 1966, *27*, n° 6, 1717.

183 - PRAKASAM (T. B. S.) et DONDERO (N. C.) - Aerobic heterotrophic bacterial populations of sewage and activated sludge. I. Numeration. *Appl. Microbiol.*, 1967, *15*, n° 3, 461-7.

184 - PRAKASAM (T. B. S.) et DONDERO (N. C.) - Aerobic heterotrophic bacterial populations of sewage and activated sludge. II. Method of characterization of activated sludge bacteria. *Appl. Microbiol.*, 1967, *15*, n° 5, 1122-37.

185 - PREVOT (A. R.) - Traité de systématique bactérienne. *Dunod*, Paris, 1961.

186 - PREVOT (A. R.), RAYNAUD (M.), FISCHER (G.) et BIZZINI (B.) - *Vième Congrès Sc. Sol, Lécpoldville*, 1954, *3*, 12 *in* POCHON et DE BARJAC (180).

187 - PREVOT (A. R.), RAYNAUD (M.), FISCHER (G.) et BIZZINI (B.) - *Annales Inst. Pasteur*, 1955, *88*, 454 *in* POCHON et DE BARJAC (180).

188 - RAYNAUD (M.), BIZZINI (B.), FISCHER (G.) et PREVOT (A. R.) - Au sujet de la disparition de la lignine dans les cultures de *Pseudomonas*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, *91*, 267-8.

189 - RAYNAUD (M.) et DASTE (P.) - Faits concernant la possibilité d'utiliser le phénol comme source de carbone par certaines bactéries rétinolytiques. *C.R. Soc. Biol.*, 1962, *156*, n° 8-9, 1489-93.

190 - RAYNAUD (M.) et DASTE (P.) - Utilisation de résines artificielles comme source de carbone par deux bactéries rétinolytiques. *C.R. Acad. Sci.*, 1962, *255*, 3495-7.

191 - RAYNAUD (M.) et DASTE (P.) - Utilisation de l'acide protocatéchique comme source de carbone par deux bactéries rétinolytiques. *C.R. Acad. Sci.*, 1966, *263*, 1539-42.

192 - RIBEREAU-GAYON (P.) - Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod*, Paris, 1968.

193 - ROBERT (A.) et DESMET (J.) - Etude spectrographique dans l'infrarouge d'une lignine native de *Populus canescens* Sm. *C.R. Acad. Sci.*, 1960, *251*, 430-2.

194 - RODIER (J.) - L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau. *Dunod*, Paris, 1960.

195 - RUSSEL (R.) et BARTOW (E.) - Bacteriological study of sewage purification by aeration. *Univ. Ill. Bull., State Water Survey Series*, 1916, *13*, 348.

196 - SANICK (I. H.) et SJOSTROM (G.) Continuous microbiological purification of waste water from paper and wallboard industries. *Acta, polytech. scand., Chem. includg Metallurgy*, 1969, n° 86, 30 pages.

197 - SATHYANARAYANA RAO (S.) et WASHINGTON (D.R.) - Effect of sewage loading on the prevalence of *Sphaerotilus natans*. *Appl. Microbiol.*, 1968, *16*, n° 6, 942-3.

198 - SCHERB (K.) - Der Verlauf der biologischen Reinigung im Tropfkörper. *Z. Wass. Abwass. Forsch.*, 1970, *3*, n° 4, 119-21.

199 - SCHEURING (L.) et HÖHNL (G.) - *Sphaerotilus natans* : Seine Okologie und Physiologie. Darmstadt, 1956.

200 - SCHMIDT (G. P.) - Zum Abwassertreichverfahren unter besonderer Berücksichtigung des Oxydationsteiches. *Z. ges. Hyg. Grenzgeb.*, 1970, *16*, n° 1, 39-47.

201 - SCHMIDT (J. P.) - L'épuration des eaux résiduaires urbaines et industrielles à l'aide des bio-disques. *La Tribune du Cébédeau*, 1970, *23*, n° 323, 453-6.

202 - SCHUBERT (W. J.) - Lignin biochemistry. *Academic Press*, New York, 1965.

203 - SÉCHET (J.) - A propos des mucilages de l'Eyre. Quelques micro-organismes jouant un rôle dans le cycle du soufre. *P.V. Soc. Lin. Bordeaux*, 1952, *95*, 47-9.

204 - SÉCHET (J.) - Epuration biologique des eaux résiduaires des papeteries Kraft "au sulfate". *Conférence Union Ingénieurs de France*, Bordeaux, 23 juin 1962.

205 - SEPTIER (G.) - Aperçu sur l'évolution des techniques d'épuration des eaux usées. *Rev. Inst. Pasteur, Lyon*, 1968, *1*, n° 4, 679-85.

206 - SIMPSON (J. R.) - A second-order equation, not based on ultimate oxygen demand, describing the first phase of oxygen up-take in biochemical oxygen demand reactions. *Wat. Pollut. Control.*, 1968, *67*, n° 4, 433-53.

207 - SISLER (F. D.) et ZOBELL (C. E.) - Nitrogen fixation by Sulfate-reducing bacteria indicated by Nitrogen/Argon ratios. *Science*, 1951, *113*, 511.

208 - SKERMAN (V.B.D.) - A guide to the identification of the Genera of Bacteria. *The Williams and Wilkins C°*, Baltimore, 1967.

209 - SMITH (R. M.) - Some systems for the biological oxidation of phenol-bearing waste waters. *Biotechnol. and Bioengng.*, 1963 paru 1964, *5*, n° 4, 275-85.

210 - Society of American Bacteriologists - Manual of microbiological methods. *Mc Graw-Hill Book C°, INC*, New York, Toronto, London, 1957.

211 - SORENSEN (H.) - Decomposition of lignin by soil bacteria and complex formation betweenautoxidized lignin and organic nitrogen compounds. *J. gen. Microbiol.*, 1962, *27*, 21-34.

212 - STOLP (H.) et STARR (M. P.) - *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n, a predatory, ectoparasitic and bacteriolytic microorganism. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1963, *29*, n° 3, 217-48.

213 - SULLIVAN (D. L.) - Biological Control essential for efficient filter operation. *Wastes Engineering*, 1963, *34*, n° 9, 468-9.

214 - SUNDMAN (V.) - Microbial decomposition of lignins. I. Identification of isovanillic acid as a breakdown product in bacterial degradation of α conidendrin. *Finska Kemists. Medd.*, 1962, *71*, 26-35.

215 - SUNDMAN (V.) - A description of some lignanolytic soil bacteria and their ability to oxidize simple phenolic compounds. *J. gen. Microbiol.*, 1964, *36*, n° 2, 171-83.

216 - SUNDMAN (V.) - The ability of α conidendrin-decomposing *Agrobacterium* strains to utilize other lignans and lignin-related compounds. *J. gen. Microbiol.*, 1964, *36*, n° 2, 185-201.

217 - SUNDMAN (V.) - A simple plate test for the determination of protocatechuic acid utilization by soil bacteria. *Canada J. Microbiol.*, 1968, *14*, n° 1, 88-9.

218 - SUNDMAN (V.) - Correlation between humification and the oxidase activity of the causative micro-organisms. *Arch. Mikrobiol.*, 1970, *72*, n° 1, 27-35.

219 - SUNDMAN (V.) et HARO (K.) - On the mechanism by which cyclolignanolitic agrobacteria might cause humification. *Finska Kemists. Medd.*, 1966, *75*, n° 4, 111-18.

220 - SUNDMAN (V.), KUUSI (T.), KUHANEN (S.) et CARLBER (G.) - Microbial decomposition of lignins. IV. Decomposition of lignin by various micropopulations. *Acta Agric. Scand.*, 1964, *14*, n° 4, 229-48.

221 - SUNDMAN (V.), KUUSI (T.), KUHANEN (S.), KILPI (S.) et SEDERHOLM (H.)- Observation on bacterial utilization of the lignin from brow rotted spruce wood and of Braun's native lignin. *Finska Kemists. Medd.*, 1968, *77*, n° 2, 70-86.

222 - TAYLOR (H.) - Some biological notes on sewage disposal process.*Proc. Ass. Sewage Disp. Wks.*, 1930, 109.

223 - TEZUKA (Y.) - Physiological studies on a strain of sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* isolated from polluted river water. *Bot. Mag. Jap.*, 1965, *78*, n° 919, 1-7.

224 - TEZUKA (Y.) - Magnesium ion as factor governing bacterial flocculation. *Appl. Microbiol.*, 1967, *15*, n° 5, 1256.

225 - THOMAS (R. E.) et BENDIXEN (T. W.) - Degradation of waste water organics in soil. *J. Wat. Pollut. Control Feder.*, 1969, *41*, n° 5, part I, 808-13.

226 - TOERIEN (D. F.), THIEL (P. G.) et HATTINGH (M. M.) - Enumeration, isolation and identification of sulphate-reducing bacteria of anaerobic digestion. *Wat. Res.*, 1968, *2*, n° 7, 505-13.

227 - TONO (T.), TANI (Y.) et ONO (K.) - Traitement microbien des eaux résiduaires des déchets industriels agricoles. I. Adsorption des lignines et purification des liqueurs contenant des lignines par les moisissures. *J. Ferment. Technol. Jap.*, 1968, *46*, n° 7, 569-76.

228 - TROJANOWSKI (J.) - Dégradation métabolique de la lignine (résumé en français). *Past. Mykrobiol. Polska*, 1967, *6*, n° 2, 151-71.

229 - TROJANOWSKI (J.) - Biological degradation of lignin. *Internation. Biodeterior. Bull.*, 1969, *6*, n° 3, 119-24.

230 - Université de Grenoble - Chimie et biochimie de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses. *Actes du Symposium international de Grenoble*, juillet 1964.

231 - VAN BENEDEN (G.) et VAN BENEDEN (P.) - La couleur des eaux (acides humiques). *La Tribune du Cébédeau*, 1969, *22*, n° 313, 626-31.

232 - VAN HORN (W. M.) - The effect of pulp and paper mill pollution on aquatic life. *Can. Pulp Pap. Industr.*, 1958, *11*, n° 8, 8-12.

233 - VICKERMANN (J. L.) - Treatment and disposal of effluent from a 450 Ton per day Kraft Pulp and Paper Mill into classified Inland Waters. *Water and Sewage Works*, 1967, *114*, n° 12, 503-7.

234 - VIRTANEN (A. I.) et HUKKI (J.) - *Suomen kem.*, 1946, *19-B*, 4 *in* POCHON et DE BARJAC (180).

235 - WAKSMAN (S.A.) - Decomposition of various chemical constituents et c. of complex plant materials by pure cultures of fungi and bacteria. *Arch. Mikrobiol.*, 1931, *2*, 136-54.

236 - WAKSMAN (S. A.) - The actinomycetes. *The Williams and Wilkins C°*, Baltimore, 1961.

237 - WATTIE (E.) - Cultural characteristics of zooglea-forming bacteria isolated from activated sludge and trickling filters. *Sewage Works J.*, 1943, *15*, 476.

238 - WINOGRADSKY (S.) et WINOGRADSKY (H.) - Etudes sur la microbiologie du sol. VII. La Nitrification - Recherches nouvelles. *Ann. Inst. Pasteur*, 1933, *50*, 350-434.

239 - WINOGRADSKY (H.) - On the number and variety of nitrifying organisms. *Trans. IIId Internat. Congr. Soil Sci.*, 1935, *1*, 138-40.

240 - WINOGRADSKY (H.) - Contribution à l'étude de la microflore nitrificatrice des boues activées de Paris. *Ann. Inst. Pasteur*, 1937, *58*, 326-40.

241 - WINOGRADSKY (H.) - Contribution à l'étude de la microflore nitrificatrice des eaux usées : Résistance des germes aux conditions défavorables. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, *76*, 35-42.

242 - WINOGRADSKY (H.) et BOUTILLIER (G.) - Contribution aux connaissances sur le processus de la nitrification dans les eaux usées : la nitrification dans l'installation septique du type S.N.C.F. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, *76*, 239-44.

243 - WINOGRADSKY (H.) et TRIOZON (F.) - Etude des causes du mauvais fonctionnement d'une station d'épuration des eaux usées. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, *90*, 388-401.

244 - WOODARD (F. E.), SPROUL (O. J.) et ATKINS (P. F. jr.) - The biological degradation of lignin from pulp mill black liquor. *J. Wat. Pollut. Control Feder.*, 1964, *36*, n° 11, 1401-10.

245 - YOUNG (R.H.F.), RYCKMAN (D. W.) et BUZZELL (J.C. jr.) - An improved tool for measuring biodegradability. *J. Wat. Pollut. Control Feder.*, 1968, *40*, n° 8, 354-68.

246 - ZEHENDER (C.) et BÖCK (A.) - Wachstums und Ernährungs bedingungen des Abwasserpilzes "*Leptomitus lacteus* Ag". Ihre bedeutung für sein Massenvorkommen in Vorflutern von Zellstoffabriken. *Zbl. Bakteriol. Parasitenkde. Infeckt. Krank. Hyg. II.*, 1964, *117*, n° 4, 399-411.

TABLE DES MATIERES

Pages

Introduction 3

Historique 7

A - Les causes de la pollution 7
B - Les conséquences de la pollution 8
C - Les remèdes appliqués 11
1. L'épuration naturelle ou auto-épuration des rivières.. 12
2. Les stations d'épuration 13
a. L'épuration des eaux domestiques 13
- Les procédés physiques 13
- Les procédés biologiques 14
Les lits bactériens 14
Les boues activées 14
La digestion des boues 20
b. L'épuration biologique des eaux résiduaires de papeterie 20
- L'épuration par boues activées 21
- Le lagunage aéré 22
- L'épandage par irrigation et infiltration 23
- Autres solutions envisagées 24
D - Les agents de la ligninolyse 24
1. La ligninolyse fongique 25
2. La ligninolyse bactérienne 26

Techniques générales et méthodes d'étude 29

A - Techniques d'épandage 29
1. Les différents procédés utilisés 30
a. Canaux d'infiltration et drains 30
b. Bassins d'infiltration 31
c. Epandage par irrigation 32
2. Les volumes d'eau résiduaire éliminés par épandage ... 32
B - Méthodes d'étude 32
1. Examen des eaux infiltrées 33
a. Prélèvements 33
b. Analyse physico-chimique 34
- pH 34
- Coloration 34
- Demande chimique en oxygène 34
- Teneur en azote total 37
- Dosage du sodium 38

c. Analyse microbiologique 38
- Numération de la microflore totale 38
- Numération des germes sulfato-réducteurs 38
- Isolement et identification des micro-organismes 39
2. Action des micro-organismes sur la dégradation des liqueurs noires 40
a. Culture des micro-organismes 40
b. Techniques mises en oeuvre pour l'étude de la biodégradation des liqueurs noires 41

Chapitre I : **Evolution des liqueurs noires au cours de leur infiltration** 43

A - Caractéristiques physico-chimiques de l'effluent 43
B - Modifications physiques 45
1. pH 45
2. Coloration 50
C - Variations biochimiques 55
1. Oxydabilité 55
2. Teneur en azote 61
3. Teneur en sodium 63
D - Synthèse des résultats 66

Chapitre II : **Interactions sol-effluent** 71

A - Variations de pH et de coloration 71
1. Dispositif expérimental d'infiltration 71
2. Etude analytique de l'infiltration 73
3. Influence du pH sur la coloration des eaux 78
B - Mise en évidence d'une relation entre les différentes caractéristiques des eaux infiltrées 80
1. Coloration, oxydabilité et azote 80
a. Coloration et oxydabilité 83
b. Evolution du rapport oxydabilité/coloration 83
c. Coloration et azote 85
2. Coloration et teneur en sodium 85
C - Résumé des résultats 86

Chapitre III : **Microbiologie des eaux** 88

A - Etude quantitative 88
1. Microflore totale 88
2. Microflore sulfato-réductrice 92
3. Résumé des résultats 94
B - Etude qualitative : Identification des souches 95
1. Bactéries 96
a. Bactéries à Gram négatif, mobiles 96
b. Bactéries à Gram négatif, immobiles 100
c. Bactéries à Gram positif, mobiles 102
d. Bactéries à Gram positif, immobiles 105

2. Espèces fongiques 109
C - Répartition des espèces : leurs relations avec le milieu naturel 112
1. Souches isolées à proximité du lieu de l'infiltration (puits 18) 113
2. Evolution des micro-organismes suivant le sens d'écoulement des eaux 115

Chapitre IV : Biodégradation des liqueurs noires 120

A - Influence des micro-organismes sur les caractéristiques physiques des liqueurs noires 120
B - Rôle des micro-organismes dans la dégradation des liqueurs noires 123
1. Recherche des conditions de culture optimales 123
a. Influence des apports azotés en milieux non tamponnés 123
b. Milieux tamponnés 132
2. Action des souches en culture pure 134
a. Rôle du glucose dans les phénomènes de biodégradation 135
b. Cultures en absence de glucose 138
3. Action des souches en associations 140
a. Ensemencements simultanés 140
b. Ensemencements successifs 141
C - Discussion des résultats 142

Synthèse des résultats et conclusions générales 144

Bibliographie 151

Second fascicule

Tableaux ..... 1 à 26
Figures ..... 1 à 35